
Master-Thesis

Frau B.Sc.
Kristin Scharf

**Vergleich, Untersuchung und
Bewertung von kulturellen und
molekularbiologischen Verfahren
zur Identifikation von Vaginitis-
Erregern**

Mittweida, 2016

Master-Thesis

Vergleich, Untersuchung und Bewertung von kulturellen und molekularbiologischen Verfahren zur Identifikation von Vaginitis- Erregern

Autor:
Frau B.Sc.

Kristin Scharf

Studiengang:
Molekularbiologie/Bioinformatik

Seminargruppe:
MO14w1-M

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde

Zweitprüfer:
Dr. med. Arno Buckendahl

Einreichung:
Mittweida, 19.08.2016

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2016

Bibliographische Beschreibung:

Scharf, Kristin: Vergleich, Untersuchung und Bewertung von kulturellen und molekularbiologischen Verfahren zur Identifikation von Vaginitis-Erregern. - 2016. - XVII, 69, IV, S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Master-Thesis, 2016

Kurzbeschreibung:

In dieser Arbeit wurden kulturelle Nachweisverfahren zur Detektion von Vaginitis Erregern mit molekularbiologischen Methoden verglichen und bewertet. Für diese Untersuchung standen Vaginalabstriche von Patientinnen zur Verfügung. Diese Vaginalabstriche wurden von Gynäkologen zur Untersuchung auf pathogene Keime in das Fachlabor „Diagnosticum“ nach Neukirchen geliefert. Es wurden folgende verschiedene Universal- und Selektionsnährmedien für den Nachweis verwendet: TSS-, MCK-, MRS-, PVX-, GAR- und CAN2-Agar. Außerdem erfolgte eine mikroskopische Beurteilung (Nugent-Score) der Abstriche. Dazu wurden die Proben nach der Gram-Färbung bei 1.000-facher Vergrößerung mikroskopisch betrachtet und bewertet. Nach der Identifizierung möglich pathogener Keime erfolgte die Resistenztestung, um für den behandelnden Gynäkologen die Auswahl des richtigen Antibiotikums zu erleichtern. Die beiden Resistenztestungssysteme, VITEK2- (bioMérieux) und Phönix-System (Becton Dickinson), basieren auf der Bestimmung der Minimalen-Hemmkonzentration. An molekularen Nachweismethoden wurde ein DNA-Hybridisierungsverfahren, Affirm-Test (Becton Dickinson), verwendet. Ferner wurden zwei Nukleinsäuren-Amplifikationsmethoden genutzt. Zum einen wurde eine Multiplex Real-Time PCR (fast-track) und zum anderen eine TMA (Transcription Mediated Amplification) Methode verwendet. Die Multiplex Real-Time PCR ermöglicht den Nachweis verschiedener Erreger (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* und *Ureaplasma parvum*). Für das TMA wurde ein Combo Assay zur Detektierung von *Chlamydia trachomatis* und *Neisseria gonorrhoeae* genutzt. Während der Masterarbeit wurden 251 Patientenproben untersucht und ausgewertet.

Bibliographic description:

Scharf, Kristin: Comparison, investigation and assessment of cultural and molecular biological procedures to the identification of vaginitis causes. - 2016. - XVII, 69, IV, S. Mittweida, University of applied sciences Mittweida, Applied Computer Sciences & Biosciences, Master-Thesis, 2016

Short description:

For this work cultural detection methods were compared and assessed with molecular-biological methods for the evidence of vaginitis causes. Vaginal swabs of patients were available for this investigation. These vaginal swabs were delivered by gynecologists to the investigation on pathogenic germs in the specialist laboratory "Diagnosticum" at Neukirchen. The following different general and selection nutrient media were used for the proof: TSS-, MCK-, MRS-, PVX-, GAR- and CAN2-agar. Moreover a microscopic judgement (Nugent score) of the swabs occurred. Gram staining was used to evaluate the samples with 1,000-fold microscopic magnification. An antimicrobial susceptibility testing was made after the identification of possibly pathogenic germs. So the treating gynecologist had an easier choice to select the right antibiotic for the disease. Both antimicrobial susceptibility tests, VITEK2-(bioMérieux) and Phönix-system (Becton Dickinson), are based on the minimal inhibitory concentration. A DNA hybridization method, Affirm test (Becton Dickinson), was used as a molecular detection method. Further two nucleic acid-amplification methods were used: a multiplex real-time PCR (fast-track) and a TMA (Transcription Mediated Amplification) method. The multiplex real-time PCR is able to detect different causes (*Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*). For the TMA a combo Assay was used for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. During the master thesis 251 patient tests were examined and evaluated.

Danksagung

Diese Master-These wurde im Rahmen des Sommersemester 2016 verfasst und dient als Abschlussarbeit für mein Masterstudium Molekularbiologie/Bioinformatik an der Hochschule Mittweida. Durch die Zusammenarbeit mit der mikrobiologischen Abteilung des Diagnosticums in Neukirchen konnte ich diese Master-These verwirklichen. Das Kollegium, unter der Führung von Herrn Dr. rer. nat. S. Scholz und Herrn Dr. med. A. Buckendahl, besitzt eine vorbildliche Arbeitseinstellung und einen sehr guten Teamgeist. Somit bot sich mir eine optimale Arbeitsumgebung. Hiermit bedanke ich mich, für das entgegengebrachte Vertrauen und die große Hilfsbereitschaft bei der mikrobiologischen Abteilung. Herrn Dr. med. A. Buckendahl, meinem Betreuer im Diagnosticum, möchte ich einen besonderen Dank aussprechen, da er mir jederzeit mit fachlichem Rat, Hilfestellungen und Verbesserungsvorschlägen zur Seite stand. Durch seine Hilfe war es mir möglich, die notwendigen Kontakte für eine erfolgreiche Zusammenarbeit zu knüpfen und alle mir zur Verfügung stehenden Ressourcen zu nutzen. Außerdem danke ich der molekularbiologischen Abteilung des Diagnosticums in Plauen, welches von Dr. med. M. Praus geleitet wird. Für wertvolle Hinweise und konstruktive Kritik möchte ich mich auch bei Dipl.- Ing. Melanie Hermann bedanken. Ein weiterer Dank, gilt meinem Betreuer von der Hochschule Mittweida, Herrn Prof. Dr. rer. nat. D. Labudde. Durch seine fachlichen Ratschläge war er mir eine große Hilfe, bei der Erstellung meiner Master-These.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Vaginitis Erreger	1
1.2 Mikroskopische und kulturelle Nachweismethoden	4
1.3 Molekularbiologische Nachweisverfahren	8
1.3.1 Nukleinsäuren-Hybridisierung	8
1.3.2 Nukleinsäure Amplifikations Test	8
1.4 Resistenzmechanismen und Therapiemöglichkeiten	10
2 Zielstellung	15
3 Material.....	16
3.1 Chemikalien	16
3.2 Nährmedien.....	17
3.3 Software	17
3.4 Geräte und Zubehör	18
4 Methoden	19
4.1 Kulturelles Verfahren	19
4.1.1 Probenanlage.....	19
4.1.2 Mikroskopischer Gramnachweis	20
4.1.3 Erregeridentifizierung	21
4.1.4 Resistenztestung.....	22
4.2 Molekularbiologisches Verfahren.....	28
4.2.1 Nukleinsäure-Hybridisierung Affirm-Test	28
4.2.2 DNA Extraktion	29
4.2.3 Multiplex Real-Time PCR	29
4.2.4 TMA Panther® (Hologic Gen-Probe).....	30
5 Ergebnisse.....	32
5.1 Ergebnisse der Mikroskopie	32
5.2 Darstellung der kulturell nachgewiesenen Erreger	36

5.3 Ergebnisse der Resistenztestung	37
5.4 Nachweis der Erreger mittels Multiplex Real-Time PCR	43
5.5 Darstellung der Ergebnisse der weiteren molekularbiologischen Tests	47
5.5.1 Nukleinsäure-Hybridisierung Affirm-Test	47
5.5.2 TMA Panther®	48
6 Diskussion	50
6.1 Vergleich der Mikroskopie mit der Kultur	50
6.2 Vergleich der kulturell ermittelten Erreger und der PCR	52
6.3 Auswertung der molekularen Verfahren	57
6.3.1 Multiplex Real-Time PCR	57
6.3.2 Nukleinsäure-Hybridisierung Affirm-Test	60
6.3.3 TMA Panther®	62
6.4 Auswertung der Resistenzstatistik	63
7 Ausblick	69
Literaturverzeichnis	IX
Anhang	XVIII
Selbstständigkeitserklärung	XXII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MALDI-TOF-MS [Kim <i>et al.</i> , 2008]	7
Abbildung 2: Keimidentifizierung mittels MALDI TOF MS	22
Abbildung 3: Das VITEK2-System.....	24
Abbildung 4: Das Phönix-System.....	27
Abbildung 5: BD Affirm™ VP III	28
Abbildung 6: Vollautomat Panther® (Hologic Gen-Probe) [URL-17]	31
Abbildung 7: Gesunder Vaginalabstrich.....	32
Abbildung 8: Drei auffällige Vaginalabstriche.....	33
Abbildung 9: Nachweis einer bakteriellen Vaginose auf dem GAR-Agar nach 48 h Bebrütung.....	37
Abbildung 10: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) ausgewählter Antibiotika von <i>Streptococcus pyogenes</i> (n = 5) im zweiten Quartal von 2016.	38
Abbildung 11: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) ausgewählter Antibiotika von <i>Escherichia coli</i> (n = 8) im zweiten Quartal von 2016. 39	
Abbildung 12: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) ausgewählter Antibiotika von <i>Ureaplasma urealyticum</i> (n = 43) im zweiten Quartal von 2016.	40
Abbildung 13: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) ausgewählter Antibiotika von <i>Mycoplasma hominis</i> (n = 5) im zweiten Quartal von 2016.	41
Abbildung 14: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) ausgewählter Antibiotika von <i>Staphylococcus aureus</i> (n = 7) im zweiten Quartal von 2016.	42
Abbildung 15: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) ausgewählter Antibiotika von <i>Streptococcus agalactiae</i> (n = 27) im zweiten Quartal von 2016.	43
Abbildung 16: Übersicht der Analyseparameter der Real-Time PCR.....	44
Abbildung 17: Darstellung der vier Ablesekanäle der Multiplex Real-Time PCR	44
Abbildung 18: Analysenübersicht der PCR.....	45

Abbildung 19: Sonden-Analysekarte von 6 getesteten Vaginalabstrichen.....	48
Abbildung 20: BLAST-Ergebnis für die urease accessory protein [<i>Ureaplasma</i> <i>urealyticum</i> WP_004025994.1]	55
Abbildung 21: Ergebnis einer PCR Analyse (Filterkombination: 465 - 510 nm)	58
Abbildung 22: Ergebnis einer PCR Analyse (Filterkombination: 618 - 660 nm)	59
Abbildung 23: Resistenztestung mittels S.I.R. Mycoplasma und Identifizierung durch MYCOPLASMA DUO Kit	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bewertung des Nugent-Score	5
Tabelle 2: Einstellungen des Detektors	9
Tabelle 3: Therapie von Vulvovaginitis [Stille <i>et al.</i> ; 2013]	12
Tabelle 4: Chemikalien	16
Tabelle 5: Nährmedien.....	17
Tabelle 6: Software	17
Tabelle 7: Geräte und Zubehör	18
Tabelle 8: Bewertungsschema von Vaginalabstrichen nach Nugent-Score	20
Tabelle 9: Beurteilungsschema der Zellbestandteile und der Keimarten	21
Tabelle 10: Antibiotika der VITEK2-Resistenzkarte AST-ST01	23
Tabelle 11: Antibiotika der Phönix-Panel für gramnegative Organismen	25
Tabelle 12: Antibiotika der Phönix-Panel für grampositive Organismen	26
Tabelle 13: Master Mix.....	29
Tabelle 14: Parameter für den Lightcycler 480	30
Tabelle 15: Mikroskopische Ergebnisübersicht.....	34
Tabelle 16: Ergebnisübersicht des Nugent-Scores	35
Tabelle 17: Mikroskopische Bewertung hinsichtlich des Nugent-Scores	35
Tabelle 18: Ergebnisübersicht der nachgewiesenen kulturell an gezüchteten Erreger... ..	36
Tabelle 19: Berechnungsformeln für die DNA Kopien der einzelnen Organismen.....	46
Tabelle 20: Ergebnisübersicht der Multiplex Real-Time PCR Urethritis plus	47
Tabelle 21: Ergebnisübersicht des Affirm-Tests	48
Tabelle 22: Ergebnisübersicht des Vollautomat Panther®	49
Tabelle 23: Vergleich von Nugent-Score und kulturell nachgewiesener bakteriellen Vaginose (BV)	50
Tabelle 24: Vergleich der kulturell detektierten <i>Mycoplasma hominis</i> mit den Ergebnissen der Multiplex Real-Time PCR	53
Tabelle 25: Vergleich der kulturell detektierten <i>Ureaplasma urealyticum</i> mit den Ergebnissen der Multiplex Real-Time PCR	53
Tabelle 26: Erweiterter Vergleich der kulturell nachgewiesenen Ureaplasmen mit den Ergebnissen der Multiplex Real-Time PCR	56

Tabelle 27: Vergleich der kulturell detektierten <i>Neisseria gonorrhoeae</i> mit den Ergebnissen der Multiplex Real-Time PCR	57
Tabelle 28: Vergleich der mit der PCR detektierten <i>Trichomonas vaginalis</i> mit den Ergebnissen des Affirm-Test	60
Tabelle 29: Vergleich der kulturell detektierten <i>Candida</i> -Spezies mit den Ergebnissen des Affirm-Test.....	60
Tabelle 30: Vergleich der kulturell detektierten <i>Gardnerella vaginalis</i> mit den Ergebnissen des Affirm-Test	61
Tabelle 31: Vergleich der mit der PCR detektierten <i>Chlamydia trachomatis</i> mit den Ergebnissen des TMA Panther	62
Tabelle 32: Vergleich der kulturell detektierten <i>Neisseria gonorrhoeae</i> mit den Ergebnissen des TMA Panther	63
Tabelle 33: Gegenüberstellung der ermittelten Resistenzen und der Häufigkeit [Stille <i>et al.</i> , 2013] von <i>Staphylococcus aureus</i>	67
Tabelle 34: Resistenztestung von <i>Streptococcus pyogenes</i> (n = 5)	XVIII
Tabelle 35: Resistenztestung von <i>Escherichia coli</i> (n = 8)	XVIII
Tabelle 36: Resistenztestung von <i>Ureaplasma urealyticum</i> (n = 43).....	XIX
Tabelle 37: Resistenztestung von <i>Mycoplasma hominis</i> (n = 5)	XIX
Tabelle 38: Resistenztestung von <i>Staphylococcus aureus</i> (n = 7).....	XIX
Tabelle 39: Resistenztestung von <i>Streptococcus agalactiae</i> (n = 27)	XX
Tabelle 40: Resistenztestung von <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (n = 2).....	XXI

Abkürzungsverzeichnis

AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
CAN2-Agar	Chromogener <i>Candida</i> -Agar
CNA-Agar	Columbia-CAN-Agar + 5% Schafblut
COS-Agar	Columbia Agar + 5% Schafblut
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GAR-Agar	Gardnerella Agar
GO	Gonorrhö
HRP	Horseradish Peroxidase
IC	Interne Kontrolle
IfSG	Infektionsschutzgesetz
KBE	koloniebildende Einheiten
MALDI TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation mit Flugzeitanalysator
MCF	McFarland
MCK-Agar	Mac Conkey Agar
MHK	Minimale Hemm-Konzentration

MRS-Agar	Man-Rogosa-Sharpe Agar
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVX-Agar	Chocolat PolyViteX Agar
PVX VCAT3-Agar	Chocolat PolyViteX VCAT3 Agar
STD	Sexually Transmitted Disease
TMA	Transcription Mediated Amplification
TSS-Agar	Trypcase Soja Agar + 5% Schafblut

1 Einleitung

In einem mikrobiologischen Fachlabor stehen zur Infektionsdiagnostik nicht nur die Erregeridentifizierung und die Anwendung der technischen Methoden im Vordergrund, sondern auch die Präanalytik und die Bewertung der Ergebnisse. Es können drei verschiedene Phasen unterschieden werden: in der ersten präanalytischen Phase liegt das Hauptaugenmerk auf der Indikation des möglichen Krankheitsbildes, der Probenauswahl und der Probenentnahme [Neumeister *et al.*, 2009]. In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungsanforderungen entscheidend. Die Anforderungen betreffen die Verpackung, die Lagerung und den Transport in das Fachlabor. An die präanalytische Phase schließt sich die analytische Phase an. Nach der Annahme der Probe in dem Fachlabor erfolgen die Eingangskontrolle und die Probenanlage, sowie die eigentliche Analytik und die Verwendung der technischen Methoden [Neumeister *et al.*, 2009]. Die daraus resultierenden Ergebnisse werden in der postanalytischen Phase medizinisch überprüft und bewertet [Neumeister *et al.*, 2009]. Der Befund wird der zuständigen Arztpraxis mitgeteilt und der behandelnde Arzt leitet unter Umständen eine Therapie ein.

1.1 Vaginitis Erreger

Um eine Beurteilung über pathogene und fakultativ pathogene Erreger im weiblichen Genitaltrakt vornehmen zu können, ist die Kenntnis über die Standardflora von großer Bedeutung. Kommt es zu einem Nachweis von pathogenen Erregern, deutet dies auf eine Fehlbesiedlung oder eine Infektion des weiblichen Genitaltraktes hin. Der Abstrich wird von einem Arzt mit Hilfe eines sterilen Tupfers von den Schleimhäuten der Vagina entnommen und in einem entsprechenden Transportmedium in ein Fachlabor gesendet. Die Keimidentifizierung und die anschließende Resistenztestung dauern in der Regel 3 Tage. Anschließend erfolgt die Behandlung in Abhängigkeit von Keimspektrum und klinischer Symptomatik.

Portio und Vagina der Frau weisen eine mikrobielle Besiedlung aus. Bei gesunden Frauen mit normalem Hormonstatus und im gebärfähigen Alter besteht die Normalflora vor allem aus Laktobazillen (u. a. *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*). Die

Döderlein-Bakterien wurden 1892 erstmals von Albert S. G. Döderlein als Milchsäure produzierende Bakterien beschrieben [Döderlein, 1892]. Sie sind grampositive Laktobazillen, welche in der Lage sind Milchsäure ($C_3H_6O_3$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu produzieren [URL-5]. Die Oberfläche der Vaginalwand besteht aus Plattenepithelen. In diese Epithelien wird unter dem Einfluss von Östrogen Glykogen eingelagert [Wenderlein, 2015]. Das Glykogen wird von den Döderlein-Bakterien zu Milchsäure ($C_3H_6O_3$) umgesetzt und dabei Wasserstoffperoxid (H_2O_2) freigesetzt, wodurch das saure Milieu (pH 3,8 - 4,4) entsteht und so pathogene Keime nicht in der Lage zur Vermehrung sind [URL-4]. Mit Hilfe des sauren Milieus wird Stickstoffmonoxid (NO) von den Epithelzellen freigesetzt, welches bakterizid und viruzid wirkt [URL-5]. Bei der Abwesenheit der hormonellen Faktoren, in der Kindheit und ab der Menopause, fehlt das eingelagerte Glykogen, welches als Nahrungsquelle für die Döderlein-Bakterien dient [Wenderlein, 2015]. Das Glykogen wird nicht mehr zu Milchsäure (Lactat) zersetzt, der pH-Wert verschiebt sich und somit geht der Schutz vor Infektionen verloren.

Die Zusammensetzung der mikrobiellen Besiedlung wird durch die Laktobazillen geregelt und bildet einen Schutz vor fakultativ pathogenen Erregern aus der Stuhlflora. Bei einer Reduzierung von Laktobazillen kann es zu einer Fehlbesiedlung in der Vagina kommen und dort Infektionen hervorrufen. Die bakterielle Vaginose ist eine der häufigsten Auswirkungen einer Fehlbesiedlung [MiQ, 2011]. Allerdings können pathogene Erreger in geringer Keimzahl zur normalen Flora gehören und lösen in diesem Fall keine Infektionen aus. Je nach Hormonzusammensetzung, dem Alter und der sexuellen Aktivität der Frau kann sich die bakterielle Besiedlung leicht verändern. Andere Einflussfaktoren für die Normalflora können der Östrogeneinfluss, die Menstruation, die Samen nach dem Geschlechtsverkehr oder sogar Fremdkörper wie Tampons sein [MiQ, 2011].

Neben den apathogenen Laktobazillen gelten die A-Streptokokken (*Streptococcus pyogenes*) als eindeutig pathogen und können Kolpitiden verursachen [MiQ, 2011]. Außerdem gilt *Staphylococcus aureus* meist in Verbindung mit *Candida albicans* als häufigster Erreger für eine Vulvitis. *Candida*-Infektionen stellen ein weltweites Problem, unabhängig von Gesellschaftsschichten und dem sozioökonomischen

Hintergrund, dar und werden meist endogen über den Gastrointestinaltrakt übertragen [MiQ, 2011]. Als pathogen zählen auch die sexuell übertragbaren Erreger *Chlamydia trachomatis* und *Neisseria gonorrhoeae* [MiQ, 2011]. *Chlamydia trachomatis* sind unbewegliche, intrazelluläre Bakterien mit einem biphasischem Entwicklungszyklus, welcher durch zwei morphologisch und funktionell verschiedene Zellformen geprägt ist: Elementarkörperchen (infektiös, metabolisch inaktiv) und Retikularkörperchen (vermehrungsfähig, nicht infektiös) [MiQ, 2011]. Chlamydien können als Verursacher für asymptomatische Verläufe in Erscheinung treten und einen möglichen Einfluss auf die Fertilität haben. Als gramnegative, aerobe, unbewegliche, nicht sporenbildende und intrazellulär gelegene Diplokokken zählen die Gonokokken (*Neisseria gonorrhoeae*) [Thomas, 2005]. Diese weltweit vorkommenden Keime sind der Auslöser für Gonorrhö, wobei oft Co-Infektionen mit Chlamydien oder anderen sexuell übertragbaren Erregern auftreten können [MiQ, 2011]. B-Streptokokken (*Streptococcus agalactiae*) und *Listeria monocytogenes* sind Erreger, welche in der Schwangerschaft in relevanter Keimzahl zu einer Infektion führen können. Während der Geburt kann es bei der Passage des Geburtskanals zu einer Übertragung auf das Neugeborene kommen und eine Sepsis auslösen. Das Bakterium *Streptococcus agalactiae* ist eine grampositive, katalasenegative, unbewegliche Kokke, welche eine β -Hämolyse ausübt [Neumeister *et al.*, 2009]. Nach der Lancefield-Einteilung gehört das Bakterium zur Gruppe B, da es das Gruppenantigen B besitzt. *Listeria monocytogenes* ist ein grampositiver, unverzweigter, kurzer, beweglicher, stäbchenartiger und fakultativ anaerober Umweltkeim [MiQ, 2011]. Da dieser fakultativ pathogene Keim weit in der Natur verbreitet ist, kann sich dieser in Lebensmitteln anreichern und so auf den Menschen übertragen werden. *Trichomonas vaginalis* gilt als ein sexuell übertragbarer Parasit und verursacht eine Entzündung des Urogenitaltraktes [MiQ, 2011].

Als klinisch bedeutsam zählen auch die urogenitalen Mykoplasmen. Die Mykoplasmen besitzen keine Zellwand und nur ein kleines Genom (5800 - 1350 kb) [MiQ, 2011]. Dadurch besitzen sie nur wenige Enzyme. Was dazu führt, dass ihnen eine Reihe von Stoffwechselreaktionen fehlt und sie somit als Saprophyten auf einen Wirt angewiesen sind. Ureaplasmen werden in zwei Biotypen und 14 Serotypen unterschieden und wurden erstmals 1954 aus dem Urogenitaltrakt bei Urethritis entnommen [MiQ, 2011]. Es werden zwischen zwei Mykoplasmen unterschieden: *Mycoplasma hominis* und

Mycoplasma genitalium, wobei *Mycoplasma genitalium* pathogener ist [URL-15]. Auch bei den Ureaplasmen wird zwischen zwei Arten unterschieden: *Ureaplasma urealyticum* und *Ureaplasma parvum*. *Ureaplasma parvum* kommt häufiger vor, aber *Ureaplasma urealyticum* ist der pathogenere Erreger [URL-15].

Die bakterielle Vaginose kann ausgelöst werden durch eine massenhafte Besiedlung mit *Gardnerella vaginalis* und verschiedenen Anaerobiern aus der Stuhlflora (z. B. *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Mobiluncus* spp., *Mycoplasma hominis*) [MiQ, 2011]. Eine Begleiterscheinung ist die starke Abnahme der Laktobazillen. Bei einer bakteriellen Vaginose erhöht sich deutlich das Risiko für eine Infektion mit sexuell übertragbaren Erregern wie Chlamydien oder Gonokokken [MiQ, 2011]. Außerdem können Entzündungen aufgrund von Fehlbesiedlungen durch andere pathogene Erreger entstehen. Während der Schwangerschaft kann eine bakterielle Vaginose u. a. einen vorzeitigen Blasensprung auslösen [MiQ, 2011]. Der Erreger *Gardnerella vaginalis* ist ein kleines, gramlabiles oder gramnegatives, kokkoides und unbewegliches Stäbchen, wobei die Zellwand dem von grampositiven Mikroorganismen entspricht [MiQ, 2011].

In dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) ist festgelegt, welche Krankheiten und welche labordiagnostischen Erregernachweise meldepflichtig sind, sodass übertragbare Krankheiten und Infektionen leichter zu erkennen und deren Ausbreitung einfacher zu unterbinden sind [URL-2]. Das sächsische Staatsministerium hat eine Erweiterung des IfSG vorgenommen, somit sind auch andere Krankheitserreger in diesem Bundesland meldepflichtig [URL-3]. Darunter zählen: *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma Spezies*, *Chlamydia trachomatis* und *Neisseria gonorrhoeae* [URL-3]. *Streptococcus agalactiae* ist nur bei Schwangeren und Neugeborenen bei einem direkten Erregernachweis meldepflichtig. Diese B-Streptokokken und die *Mycoplasma Spezies* müssen namentlich an das Gesundheitsamt gemeldet werden [URL-3]. Nicht namentlich müssen der direkte Nachweis der Erreger *Chlamydia trachomatis* und *Neisseria gonorrhoeae* an das Gesundheitsamt gemeldet werden [URL-3].

1.2 Mikroskopische und kulturelle Nachweismethoden

Um eine bessere Beurteilung von der Anzahl der Keime bei der Mikroskopie von Vaginalsekreten vornehmen zu können, wurde 1991 der Nugent-Score von Nugent,

Krohn und Hillier etabliert (Tabelle 1) [Nugent *et al.*, 1991]. Dabei werden die Laktobazillen, gramnegative Stäbchen und Mobiluncusarten pro Gesichtsfeld bei 1.000facher Vergrößerung bewertet [Mending *et al.*, 2006]. Diese Bewertung gibt eine Wahrscheinlichkeit für die bakterielle Vaginose an [URL-1]. Ein Nugent-Score von 0-3 deutet auf eine Normalflora hin. Sobald der Score einen Wert von 7-10 annimmt, kann von einer bakteriellen Vaginose aus gegangen werden. Die Werte dazwischen sind noch klinisch unklar und könnten auf ein Vorstadium der bakteriellen Vaginose hindeuten [Mending *et al.*, 2006].

Tabelle 1: Bewertung des Nugent-Score

Nach dieser Tabelle kann eine Patientenprobe mit Hilfe des Nugent-Scores bewertet werden.

Punktzahl	Bewertung	Beschreibung
0 - 3 Punkte	Negativ	Es liegt keine bakterielle Vaginose vor.
4 - 6 Punkte	Intermediär	Das Ergebnis muss im Zusammenhang mit anderen Resultaten (Symptome oder kultureller Nachweis) interpretiert werden.
4 - 6 Punkte + Z		
Ab 7 Punkte	Positiv	Es ist von einer bakteriellen Vaginose auszugehen.

Neben der Mikroskopie dienen Verfahren zur Vermehrung von Bakterien als Grundlage für die Identifizierung. So werden medizinisch relevante Erreger u. a. auf Nährmedien kultiviert. Da die meisten Erreger heterotroph sind, benötigen sie neben Mineralsalzen, Metallen, Wasser und Vitaminen vor allem eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle für die Vermehrung [Neumeister *et al.*, 2009]. Diese werden den Nährmedien oft in Form von Peptonen zugesetzt. Den Nährmedien können auch noch selektive Zusätze oder Indikatorsubstanzen beigemischt werden, um die Identifizierung zu erleichtern. Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Arten von Nährmedien: flüssige und feste Nährmedien. Die flüssigen Nährmedien (Bouillons) werden hauptsächlich zur Anreicherung von Bakterien eingesetzt. Die festen Nährmedien enthalten Agar, welcher durch viele Mikroorganismen nicht abgebaut werden kann.

Universalmedien werden im Bereich der Bakteriologie als Übersichtsmedien zum ungezielten Nachweis möglichst vieler Erreger verwendet, da diese ein reichhaltiges Nährstoffangebot und keine wachstumshemmenden Zusätze besitzen. Als Grundlage für diese Nährmedien dienen Fleisch- und Hefeextrakte, Peptone, Serum und Blut

[Neumeister *et al.*, 2009]. Das Nährmedium Trypcase Soja Agar (TSS) ist ein Vertreter eines solchen Übersichtsmediums. Durch den Zusatz von Blut können die Hämolyseeigenschaften von Erregern beurteilt werden.

Den Optimalnährmedien sind zusätzlich Nährstoffe beigelegt, welche eine Anzucht von anspruchsvolleren Mikroorganismen ermöglichen. Dem Chocolat PolyViteX Agar (PVX) wird erhitztes Schafsblut (Kochblut) und weitere Wachstumsfaktoren zugesetzt, um die Kultivierung von speziellen Erregern wie *Neisseria gonorrhoeae* zu gewährleisten [Neumeister *et al.*, 2009].

Bei den selektiven Differenzialmedien werden durch chemische Zusätze oder Antibiotika unerwünschte Begleitkeime unterdrückt und zusätzlich können durch geeignete Substrate oder Indikatoren die Zielkeime anhand charakteristischer Pigmentierung der Kolonie oder des umliegenden Agars differenziert werden [Neumeister *et al.*, 2009]. Der MacConkey Agar (MCK) dient zur Kultivierung gramnegativer Erreger, indem Gallensalze und Kristallviolett das Wachstum grampositiver Bakterien hemmen. Der Columbia-CNA-Agar (CNA) unterstützt das Wachstum grampositiver Mikroorganismen und erlaubt die Differenzierung dieser anhand ihrer Hämolyseeigenschaften. Die Hemmung gramnegativer Bakterien begründet sich auf dem Zusatz der Antibiotika Colistin und Nalidixinsäure.

Zur Unterscheidung von Bakterien bei einer Mischkultur werden Nährmedien mit chromogenem Substrat eingesetzt. An die chromogenen Substrate (z. B. Kohlehydrate, Aminosäuren, Phosphate) sind Chromophore gebunden, welche bei der Verstoffwechselung abgespalten werden und die Kolonie anfärben. Bei dem chrom IDTM Candida Agar (CAN2) werden das Wachstum von Bakterien durch Antibiotika gehemmt und die Chromophore durch Enzyme (z. B. β -D-Galactosaminidase von *Candida albicans*) gespalten [Neumeister *et al.*, 2009]. So kann *Candida albicans* durch eine Blaufärbung von anderen *Candida*-Arten unterschieden werden. Mit dem chromogenen MRS-Agar mit HRP (Horseradish Peroxidase) können Wasserstoffperoxid-produzierende Döderlein-Bakterien von sonstigen Laktobazillen unterschieden werden. Dazu bilden Wasserstoffperoxid-produzierende Bakterien an Luftstauerstoff blaue Kolonien.

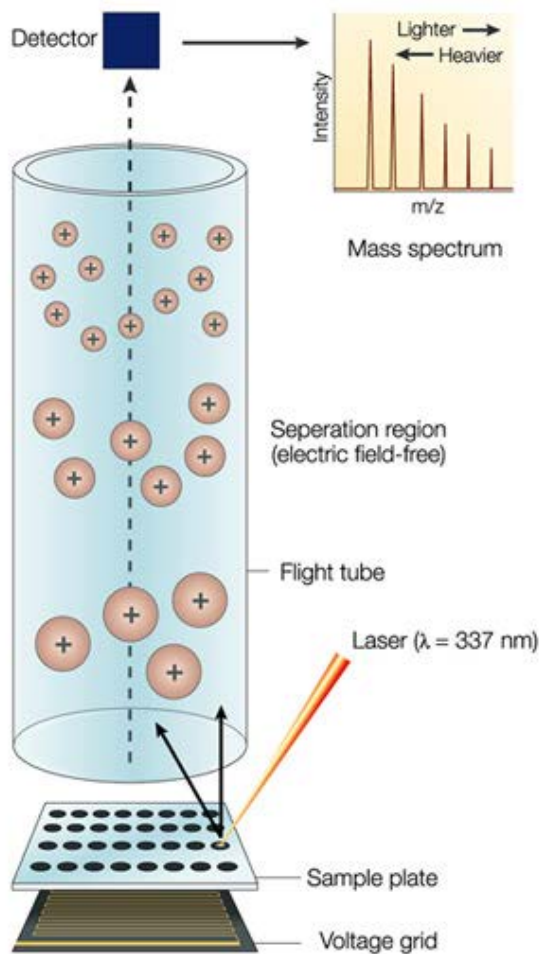


Abbildung 1: MALDI-TOF-MS [Kim *et al.*, 2008]

Diese Abbildung zeigt das MALDI-TOF-MS Verfahren. Auf einem Target werden Probe und Martix aufgetragen. Die Desorption und Ionisation der Probe erfolgt durch die Matrix. Nach dem Laserbeschuss werden die Teilchen in einem elektrischen Feld beschleunigt und nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis getrennt. Der Detektor misst die unterschiedlichen Flugzeiten und gibt diese als Spektrogramm raus.

Für die genaue Identifizierung morphologisch unterschiedlicher Kolonien kann das MALDI-TOF-MS Verfahren (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation - Flugzeitanalysator - Massenspektrometrie) genutzt werden. Eine Darstellung der Apparatur ist in Abbildung 1 zu sehen. Im ersten Schritt wird die Probe ionisiert (MALDI), danach erfolgt die Flugzeitbestimmung (TOF), so dass ein Spektrogramm erzeugt und ausgewertet werden kann [Fuchs, 2012].

1.3 Molekularbiologische Nachweisverfahren

1.3.1 Nukleinsäuren-Hybridisierung

Bei einem Nukleinsäure-Hybridisierungstest verbinden sich komplementäre Nukleinsäurenstränge zu spezifischen doppelsträngigen Hybrid-Komplexen. Dadurch können verschiedene Nukleotidsequenzen charakterisiert, identifiziert und lokalisiert werden [URL-6].

Der mikrobiologische Identifizierungstest (DNA-Sondentest) BD Affirm™ VP III identifiziert *Candida* Spezies, *Gardnerella vaginalis* und *Trichomonas vaginalis*. Für jeden Organismus werden zwei Sonden verwendet, eine Einfang- und eine Farbreaktionssonde. Diese Sonden sind komplementär zu der genetischen Sequenz der verschiedenen zu untersuchenden Organismen. Auf einer Sonden-Analysekarte sind Perlen eingebettet, welche auf der Oberfläche die Einfangsonden der Organismen enthalten. In der Reagenzkassette sind die Farbreaktionssonden lokalisiert. Um die Nukleinsäure freizusetzen, wird in die Probe eine Lysislösung gegeben und erhitzt. Mit Hilfe eines Puffers wird die freigesetzte Nukleinsäure stabilisiert und das benötigte Milieu für die Hybridisierung erzeugt. Danach erfolgt die eigentliche Hybridisierung. Ein Indikatorsubstrat führt bei einem positiven Testergebnis zu einer Farbreaktion, so dass die Ablesung vereinfacht wird.

1.3.2 Nukleinsäure Amplifikations Test

PCR (Polymerase Chain Reaction)

Als Hauptnachweisverfahren von Nukleinsäuren dient die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR beruht auf der Amplifikation von DNA und/oder RNA. Somit können auch geringe Nukleinsäure Mengen nachgewiesen werden. Die PCR besteht aus drei verschiedenen Schritten: der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation.

In der Praxis wird die PCR zum Nachweis von verschiedenen viralen und bakteriellen Erregern verwendet. Dabei wurden mit der Zeit verschiedene Techniken entwickelt, u.a. real-time PCR, qPCR, RT-PCR. Um mehrere Erreger gleichzeitig detektieren zu können, werden Multiplex-PCRs eingesetzt, so z. B. die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte FTD Urethritis plus Multiplex-PCR (fast-track). Mit Hilfe dieser PCR

können 7 verschiedene Vaginitis-Erreger aus Vaginalabstrichen, Kultur oder Urin nachgewiesen werden. Zusätzlich wird eine interne Kontrolle (IC) zur Überprüfung der DNA Extraktion und der PCR für jede Probe mitgeführt. Dafür werden zwei verschiedene Primer-Mixe bereit gestellt. Nach der Durchführung der PCR erfolgt die Auswertung über 4 verschiedene Ablesekanäle (Wellenlängen). In Tabelle 2 ist eine Übersicht für die PCR Auswertung dargestellt.

Tabelle 2: Einstellungen des Detektors

Diese Tabelle zeigt die zwei PPMixe der Multiplex Real-Time PCR. Mit jedem PPMix lassen sich verschiedene Erreger auf verschiedenen Detektionswellenlängen (nm) nachweisen.

Primer-Mix	Erreger	Detektionswellenlänge (nm)
1	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	520
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	550
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	610
	mCMV (IC)	670
2	<i>Trichomonas vaginalis</i>	520
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	550
	<i>Ureaplasma parvum</i>	610
	<i>Mycoplasma hominis</i>	670

Da eine kulturelle Differenzierung bei einigen Erregern nicht möglich ist oder manche Erreger kulturell nicht nachweisbar sind, z. B. *Mycoplasma genitalium*, wird die PCR als Methode der Wahl vorgeschlagen [URL-15].

TMA (Transcription Mediated Amplification)

Eine Methode der Zielsequenz-Amplifikation ist die TMA. Diese Amplifikationsmethode verläuft bei einer konstanten Temperatur. Als Ausgangsmaterial dient die einzelstängige RNA, somit kann der notwendige reverse Transkriptase Schritt, welcher zu Beginn einer PCR notwendig ist, entfallen. Von dem angelagerten Primer wird mittels reverse Transkriptase ein zu der RNA komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Ein komplementärer Primer lagert sich nun den gebildeten

DNA-Strang an und die reverse Transkriptase synthetisiert auf Grund ihrer Polymeraseaktivität einen neuen komplementären DNA-Strang [Thomas, 2005].

Mit Hilfe molekularer Beacons ist das Messsignal konstant und erlaubt quantitative Ergebnisse [Thomas, 2005]. Die molekularen Beacons sind spezielle Hybridisierungssonden. Zum einen besitzen diese eine haarnadelförmige DNA-Struktur, welche zueinander komplementär sind, und zum anderen besitzt diese eine Loop-Region, welche komplementär zu der Zielsequenz ist [Thomas, 2005]. An den 3'- und 5'-Enden der Beacons sind Fluorophore gebunden. Der eine Fluorophor agiert als Donor (meist Fluorescein) und der andere als Akzeptor (meist Dabcyl), um die Fluoreszenz zu absorbieren [Thomas, 2005]. Sobald der molekulare Beacon an die Zielsequenz bindet, öffnet sich die Haarnadel-Struktur, so dass die beiden Chromophore räumlich getrennt werden und die Fluoreszenz-löschende Funktion des Akzeptors aufgehoben wird [Thomas, 2005]. Das anschließend detektierbare Fluoreszenzsignal entspricht der Menge der Ziel-RNA.

Der Vollautomat Panther® (Hologic|Gen-Probe) basiert auf dem TMA Verfahren. Das Aptima Combo 2 for CT/NG Assay dient zur Identifizierung von *Chlamydia trachomatis* und *Neisseria gonorrhoeae* [URL-7].

1.4 Resistenzmechanismen und Therapiemöglichkeiten

Da Bakterien in der Lage sind sich an veränderten Umweltbedingungen anzupassen, können sie Resistenzen gegenüber Antibiotika ausbilden. Es werden grundsätzlich zwischen 2 Resistenzarten unterschieden: die primäre und die sekundäre Antibiotikaresistenz. Bei einer Wirkungslücke gegenüber einem bestimmten Antibiotikum einer Gattung oder einer Art wird dies als primäre Antibiotikaresistenz bezeichnet. So wirken Cephalosporine nicht bei Enterokokken. Bildet ein Bakterium eine Resistenz gegenüber einem vorher wirksamen Antibiotikum, handelt es sich hierbei um eine sekundäre Antibiotikaresistenz. Dieses Phänomen tritt aufgrund von Mutationen oder Übertragungen durch Plasmiden auf [Stille *et.al*, 2013]. Als weitere Resistenzarten zählen die Kreuzresistenz und die Multiresistenz. Bei der Kreuzresistenz entstehen Resistenzen gegenüber Antibiotika mit einer ähnlichen chemischen Struktur oder einer ähnlichen Wirkungsweise, wie bei Penicillinen und Cephalosporinen. Bei einer Unwirksamkeit von Antibiotika verschiedener Klassen gegenüber Bakterien wird

von multiresistenten Keimen gesprochen. Ein Beispiel dafür ist der Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Für die Therapie von Krankheiten ist es notwendig zu wissen, ob der Erreger eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum besitzt. Dafür werden in Fachlaboren Resistenzen in der Regel mittels automatisierter Verfahren (z. B. VITEK2- und Phönix-System) getestet. Als Grundlage für das VITEK2-System dient die Bestimmung der minimalen Hemm-Konzentration (MHK). Dabei wird die Konzentration einer Substanz gemessen, bei der das Wachstum von Mikroorganismen gerade noch gehemmt wird. In den Vertiefungen von Mikrotitrationsplatten befinden sich definierte Antibiotikakonzentrationen. Mit Hilfe des Titerverfahrens wird die MHK errechnet. Dabei misst das VITEK2-System photometrisch nach der Inkubationszeit eine Konzentration und errechnet anhand dieser die Wachstumskinetik. Das Antibiotogramm wird anschließend dem Nutzer zur Verfügung gestellt. Bei der Mikro-Bouillondilution (z. B. Phönix-System) werden ein Bouillonmedium und ein definiertes Inokulum eines Erregers über Nacht in den Mikrotitrationsplatten inkubiert [Neumeister *et al.*, 2009]. Nach der Inkubationszeit erfolgen automatisch die photometrische Bestimmung des MHK-Wertes und die Interpretation (sensibel, intermediär, resistent). Die Vorteile bei diesem Verfahren liegen bei dem großen Spektrum an gleichzeitig messbaren Antibiotika (Mikrotiterplatten), in der Standardisierbarkeit (geringere Fehlerrate) und der quantitativen Daten (aussagekräftiger) [URL-10]. Im Gegensatz dazu stehen die Nachteile des Verfahrens: die hohen Kosten und die geringere Flexibilität bezüglich der getesteten Antibiotika [URL-11].

Um das richtige Antibiotikum auszuwählen, müssen verschiedene Gesichtspunkte beachtet werden. Dabei muss ein optimales Nutzen-Risiko-Verhältnis für den Patienten beachtet werden. Dies ist von vielen unterschiedlichen Faktoren abhängig. Darunter zählen, u.a. die klinische Situation des Patienten, die nachgewiesenen Erreger, sowie die zugehörige Resistenztestung, die Eigenschaften des Antibiotikums und die ökonomischen Aspekte [Stille *et al.*; 2013]. Bei einer Infektion des äußeren Genitaltraktes handelt es sich in der Regel um eine Mischflora von verschiedenen fakultativ pathogenen Keimen. Deshalb wird vorerst die Infektion ungezielt behandelt, allerdings in Abhängigkeit von den auftretenden Erregern und ihrer Häufigkeit [Stille *et*

al.; 2013]. Bei einem Erregernachweis von *Streptococcus pyogenes* ist eine großzügige Antibiotika-Prophylaxe notwendig [Stille *et al.*; 2013]. Als Mittel der Wahl zur Behandlung einer *Streptococcus pyogenes* Infektion wird Penicillin G oder Penicillin V empfohlen [Darai *et al.*, 2012]. *Escherichia coli* wird nur bei relevanter Anzahl, während der Schwangerschaft oder bei Beschwerden der Patientin behandelt. Zum Einsatz kommen hier Aminopenicilline, Cephalosporine, Carbapeneme oder Chinolone [Stille *et al.*, 2013]. Die gezielte Auswahl des richtigen Antibiotikums richtet sich nach der Antibiotikaempfindlichkeitstestung des Keimes. Ebenso wie *Streptococcus pyogenes* wird *Staphylococcus aureus* in jedem Fall behandelt. Für die Therapie werden vor allem β -Lactam-Antibiotika verwendet. Zu den β -Lactam-Antibiotika zählen Penicillinase-feste Penicilline wie Oxacillin oder Cephalosporine. Außerdem kommen oft eine Kombination aus Cephalosporinen und Clindamycin zum Einsatz [Darai *et al.*, 2012]. Für die in der Schwangerschaft relevanten B-Streptokokken stellen Penicilline das Mittel der Wahl dar. Cefazolin und Clindamycin kommen bei einer Penicillin-Allergie der Patientin zur Anwendung [Leitlinie S2k + IDA AWMF, 2012]. Cefazolin ist ein Medikament aus der Gruppe der Cephalosporine und Clindamycin gehört zu den Lincosamiden.

Eine Vaginitis tritt oft im Zusammenhang mit einer Vulvitis, Zervizitis oder Urethritis auf. Bei der Vulvovaginitis werden üblicherweise drei häufige Formen unterschieden: bakterielle Vaginose, Candida-Vaginitis und Trichomonaden-Vaginitis [Stille *et al.*; 2013]. Die Therapiemöglichkeiten während der Schwangerschaft unterscheiden sich von der Therapie der Wahl und sind in Tabelle 3 dargestellt:

Tabelle 3: Therapie von Vulvovaginitis [Stille *et al.*; 2013]

Abgebildet sind in dieser Tabelle drei mögliche Krankheitsausprägungen der Vulvovaginitis mit ihren Therapiemöglichkeiten.

Krankheit:	Therapie der Wahl	Therapie in der Schwangerschaft
Vulvovaginitis		
Bakterielle Vaginose	Metronidazol	Amoxicillin
Candida-Vaginitis	Clotrimazol	Nystatin
Trichomonaden-Vaginitis	Metronidazol oder Tinidazol	Natamycin

Ein Hauptvertreter der Nitroimidazole ist das Antibiotikum Metronidazol. Neben dem Hauptvertreter gehört auch Tinidazol in diese Gruppe von Antibiotika. Nitroimidazole hemmen die Nukleinsäuresynthese von Mikroorganismen und wirken somit stark bakterizid [Stille *et al.*, 2013]. Besonders gut wirken diese Medikamente bei Anaerobier und Protozoen [URL-8]. Sollte bei einer bakteriellen Vaginose eine Schwangerschaft vorliegen, so wird die Leitsubstanz der Aminopenicilline, Amoxicillin, als Therapie verwendet, da Metronidazol fetotoxisch wirken kann [URL-8]. Amoxicillin ist bakterizid und hemmt die Zellwand-Peptidoglykansynthese [Stille *et al.*, 2013]. In verschiedenen Studien konnte kein erhöhtes Risiko von Fehlbildungen des Fötus während der Schwangerschaft bei Vergabe von Amoxicillin festgestellt werden [URL-9]. Azole dienen vor allem zur lokalen Behandlung von oberflächlichen Pilzinfektionen. Clotrimazol ist ein Derivat von Azolen und besitzt eine fungistatische Wirkung [Stille *et al.*, 2013]. Da bei der Behandlung mit Clotrimazol während der Schwangerschaft ein erhöhtes Abortrisiko besteht, wird Nystatin, welches eine Störung des Zellmembranpotenzials von verschiedenen Pilzen hervorruft, als Alternative verwendet [Stille *et al.*, 2013]. Natamycin gehört in die Gruppe der Polyene und ist neben der fungistatischen Wirkung auch bei einer Behandlung gegen Trichomonaden wirksam [Stille *et al.*, 2013].

Die bakterielle Vaginose sollte vor allem während der Schwangerschaft auch bei asymptomatischen Patientinnen behandelt werden, da diese ein erhöhtes Risiko für einen vorzeitigen Blasensprung oder spontane Aborte darstellt [Leitlinie S1 AWMF; 2013]. Eine Behandlung einer gestörten Vaginalflora bzw. einer bakteriellen Vaginose während der Schwangerschaft verringert das Risiko einer Fehlgeburt und einer spontanen Frühgeburt merklich [Ugwumadu *et al.*, 2003]. Neben Amoxicillin kann auch Clindamycin zur Therapie der Infektion verwendet werden [Ugwumadu *et al.*, 2003].

Bei den sexuell übertragbaren Krankheiten (STD) handelt es sich um Erkrankungen, welche hauptsächlich durch sexuelle Kontakte übertragen und verbreitet werden. Dazu gehört u.a. Gonorrhoe. Ceftriaxon wird als Standardtherapie, auch in der Schwangerschaft, empfohlen, da es kein erhöhtes Fehlbildungsrisiko und fetotoxisches Risiko während der Schwangerschaft aufweist [Leitlinie S2k AWMF, 2013; URL-13]. Bei einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis* wird Doxycyclin als Mittel der Wahl

empfohlen [Leitfaden STI-Therapie DSTIG, 2014]. Da Doxycyclin, als Gruppe der Tetracycline, sich während der Schwangerschaft an Calciumionen in den Zahnanlagen und Knochen bei dem Fötus anlagern kann, wird als Alternative Azithromycin empfohlen [URL-14].

Eine Partnertherapie ist bei Gonorrhoe, Trichomonaden-, *Candida*- und Chlamydien-Infektion empfohlen [Leitfaden STI-Therapie DSTIG, 2014].

Zu den STD-Erregern zählen *Ureaplasma urealyticum* und *Mycoplasma genitalium* [URL-16]. Für den pathogenen Erreger *Ureaplasma urealyticum* wird als Standard Antibiotikum Doxycyclin und während der Schwangerschaft Clarithromycin empfohlen [Leitfaden STI-Therapie DSTIG, 2014]. Für *Mycoplasma genitalium* wird Azithromycin als Mittel der Wahl beschrieben [Leitfaden STI-Therapie DSTIG, 2014]. Bei einer Azithromycin-Resistenz kann alternativ das Medikament Moxifloxacin Anwendung finden [Leitfaden STI-Therapie DSTIG, 2014].

2 Zielstellung

In dieser Arbeit werden verschiedene mikrobiologische und molekularbiologische Screening-Methoden zur Identifizierung pathogener Mikroorganismen in Vaginalabstrichen vorgestellt. Der Nachweis von Erregern ist notwendig, um eine Bewertung der mikrobiellen Besiedlung des weiblichen Genitaltraktes vorzunehmen. Anhand dieser Bewertung kann eine Fehlbesiedlung oder mögliche Infektion abgeleitet werden.

Ziel dieser Arbeit war der Vergleich der kulturellen Nachweismethoden mit molekularbiologischen Analysen. Zu dem kulturellen Verfahren zählt eine mikroskopische Untersuchung, das Anzüchten der Erreger auf verschiedenen Nährmedien mit Identifizierung und möglicher Resistenzbestimmung. Für die molekularbiologischen Analysen wurde eine Multiplex Real-Time PCR verwendet. Außerdem standen ein Nukleinsäure-Hybridisierungstest und eine TMA (Transcription Mediated Amplification) Methode zur Verfügung.

3 Material

3.1 Chemikalien

Tabelle 4: Chemikalien

Diese Tabelle listet die verwendeten Chemikalien auf.

Chemikalien	Hersteller
0,9 % NaCl-Lösung	bioMérieux, Nürtingen
Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Aptima Combo 2 for CT/NG assay	Hologic Deutschland GmbH, Wiesbaden
FTD LightCycler 480 Colour Compensation	fast-track Diagnostics, Luxemburg (Luxenburg)
FTD Urethritis plus	fast-track Diagnostics, Luxemburg (Luxenburg)
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Matrix (α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure)	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
MYCOPLASMA DUO Kit	Bio-Rad Laboratories, München
Nalidixinsäure	OXOID Deutschland GmbH, Wesel
Oleandomycin	OXOID Deutschland GmbH, Wesel
S.I.R. Mycoplasma	Bio-Rad Laboratories, München
Staph Plus Latex Kit	DiaMondial, Vienna (Österreich)
Streptococcal grouping latex, Strep kit	DiaMondial, Vienna (Österreich)

3.2 Nährmedien

Tabelle 5: Nährmedien

Diese Tabelle listet die verwendeten Nährmedien auf.

Nährmedium	Hersteller
CAN2-Agar (chrom IDTM Candida Agar)	bioMérieux, Nürtingen
CNA-Agar (Columbia-CNA-Agar + 5 % Schafblut)	bioMérieux, Nürtingen
GAR-Agar (Gardnerella Agar)	bioMérieux, Nürtingen
MCK-Agar (Mac Conkey Agar)	bioMérieux, Nürtingen
MRS-Agar mit HRP(Man-Rogosa-Sharpe Agar mit Horseradish Peroxidase)	OXOID Deutschland GmbH, Wesel
PVX-Agar (Chocolat PolyViteX Agar)	bioMérieux, Nürtingen
PVX VCAT3-Agar (Chocolat PolyViteX VCAT3 Agar)	bioMérieux, Nürtingen
SAB-Agar	OXOID Deutschland GmbH, Wesel
TSS-Agar (Trypcase Soja Agar + 5% Schafblut)	bioMérieux, Nürtingen

3.3 Software

Tabelle 6: Software

Diese Tabelle listet die verwendeten Programme auf.

Software	Hersteller
Compass Software 1.2 SR for flex	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
BD EpiCenter™ Microbiology Data Management System	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Hybase 6 Statistik	Tieto Deutschland GmbH
LightCycler® 480 Software	Roche Diagnostics, Mannheim
MALDI Biotyper 3	Bruker Daltonik GmbH
Medizinisches Informationssystem	CSMed GmbH
PROMED-open	MCS Modulare Computer und Software Systeme AG
VITEK 2 Advanced Expert System	bioMérieux, Nürtingen
VITEK 2 Systems Software	bioMérieux, Nürtingen

3.4 Geräte und Zubehör

Tabelle 7: Geräte und Zubehör

Diese Tabelle listet die verwendeten Geräte und ihr Zubehör auf.

Geräte und Zubehör	Hersteller
BD Affirm™ VP III	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD MicroProbe™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD Phoenix™ AP System	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD Phoenix™ Automated Microbiology System	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Impföse (1µ, 10µ), steril	nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
LightCycler® 480 Instrument II	Roche Diagnostics, Mannheim
MALDI Biotyper-Microflex LT 60	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
MSP 96 Target polished steel, microScout Target	Bruker Daltonik GmbH, Bremen
Panther® (Hologic Gen-Probe)	Hologic Deutschland GmbH, Wiesbaden
Phoenix AST Broth (8 und 4,5 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Phoenix ID Broth	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Phoenix NMIC-402	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Phoenix NMIC/ID-402	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Phoenix Panel Caddy	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Phoenix PMIC-75	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Phoenix PMIC/ID-88	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Poly Stainer Färbeautomat	ILU Instruments S. A., Königswinter
VITEK 2	bioMérieux, Nürtingen
VITEK 2 – smart carrier	bioMérieux, Nürtingen
VITEK 2-Resistenzkarte AST-ST01	bioMérieux, Nürtingen
Vortexer REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG

4 Methoden

4.1 Kulturelles Verfahren

4.1.1 Probenanlage

Die Entnahme der Probe (Vaginalabstrich) erfolgt durch einen Facharzt mit einem Abstrichtupfer. Nach dem Einsenden der Probe in ein Fachlabor wird der Vaginalabstrich auf einem definiertem Plattensatz ausgestrichen. Nach 24 h bzw. 48 h erfolgen die Erregeridentifizierung und die Resistenztestung pathogener Keime. Als Vaginalabstrich wurde ein Abstrichtupfer mit Amies- oder Amies-Kohle-Transportmedium verwendet.

Bei einer Anforderung von Vaginalabstrichen auf pathogene Keime steht ein fester Mediensatz zur Verfügung: TSS-, MCK-, MRS-, PVX-, GAR- und CAN2-Agar. Auf der Übersichtsplatte (TSS-Agar) wurde zuerst Material aufgetragen und anschließend dreifach fraktioniert ausgestrichen. In die erste Fraktion wurde ein Nalidixin-Plättchen zur Unterscheidung von gramnegativen Stäbchen aufgelegt. Als Selektionsmedien wurden MCK-, PVX-, und GAR-Agar verwendet. Da für jede Probe eine halbe Platte dieser Selektionsmedien bereitsteht, wurden diese nach dem Aufbringen von Probematerial zweifach fraktioniert ausgestrichen. Auf den PVX-Agar wurde zusätzlich ein Oleandomycin-Plättchen zur Unterscheidung von grampositiven Kokken in die erste Fraktion aufgelegt. Als ein weiteres Selektionsmedium steht ein Viertel eines CAN2-Agars bereit. Bei diesem Medium wurde an einer Stelle etwas Material vom Abstrich aufgetragen und anschließend mit einer sterilen Impföse ein Viertel ausgestrichen. Als chromogenes Selektionsmedium diente der MRS-Agar. Nach dem aufbringen des Probenmaterials wurde dies mit einer Impföse auf einer halben Platte zweifach fraktioniert ausgestrichen. Zur Identifizierung und Differenzierung genitaler Mykoplasmen wurde das Kit MYCOPLASMA DUO von Bio-Rad genutzt und nach Anleitung verwendet.

Bei einer expliziten Anforderung auf Gonorrhö (GO) wurden weniger Platten verwendet. Als Übersichtsplatte wurde der TSS-Agar dreifach fraktioniert

ausgestrichen. Der PVX VCAT3-Agar dient hier als Selektionsmedium. Nach dem Aufbringen von Probematerial wurde dreifach fraktioniert ausgestrichen.

Die Medien TSS-, MCK- und CAN2-Agar, sowie das Kit MYCOPLASMA DUO wurden aerob bei 36 ± 1 °C inkubiert. Die Medien PVX-, GAR- und PVX VCAT3-Agar wurden bei 36 ± 1 °C im CO₂-Brutschrank (5 % CO₂) inkubiert. Die Auswertung der Platten erfolgt nach 24 h und nach 48 h. Der MRS-Agar mit HRP wurde anaerob bei 36 ± 1 °C bebrütet. Die Auswertung erfolgt nach 48 h.

Zur Differenzierung der Bakterien anhand ihrer Zellwandeigenschaften wurde die Gramfärbung verwendet und dient somit als Unterstützung des kulturellen Nachweises von Erregern.

4.1.2 Mikroskopischer Gramnachweis

Auf einen Objektträger wurde Material von dem Vaginalabstrich gebracht und angetrocknet. Nach einem kurzen Hitzeschock in der Mikrowelle wurde eine Gramfärbung im Färbeautomat durchgeführt und anschließend bei 1.000-facher Vergrößerung mikroskopiert. Bei der Mikroskopie wurden neben dem Nugent-Score (Tabelle 8) auch die Zellbestandteile und die Keimarten (Tabelle 9) ermittelt.

Tabelle 8: Bewertungsschema von Vaginalabstrichen nach Nugent-Score

Diese Tabelle dient als Schema zur Bewertung von Vaginalabstrichen. Es werden die Keime pro fünf Gesichtsfelder (GF) gezählt und daraus der Durchschnitt gebildet.

Laktobazillen	Gramnegative Stäbchen / Gardnerellen	Gebogene Stäbchen
> 30/GF = 0	0/GF = 0	0/GF = 0
6 - 30/GF = 1	< 1/GF = 1	< 1 - 5/GF = 1
1 - 5/GF = 2	1 - 5/GF = 2	> 6/GF = 2
< 1/GF = 3	6 - 30/GF = 3	Clue cells nicht vorhanden = 0
0/GF = 4	> 30/GF = 4	Clue cells vorhanden = Z

Tabelle 9: Beurteilungsschema der Zellbestandteile und der Keimarten

Dieses Schema zeigt die Beurteilung der vorkommenden Zellbestandteile und möglichen Keimarten für Vaginalabstriche. Es werden die Keime pro fünf Gesichtsfelder (GF) gezählt und daraus der Durchschnitt gebildet.

Zellbestandteile			Keimarten		
Detritus	Leukozyten	Epithelien	Grampositive Kokken	Coryneforme Stäbchen	Sprosszellen
Nicht vorhanden = 0	Nicht vorhanden = 0	Nicht vorhanden = 0	Nicht vorhanden = 0	Nicht vorhanden = 0	Nicht vorhanden = 0
	< 10/GF = 1	< 10/GF = 1	< 10/GF = 1	< 10/GF = 1	
		1			
Vorhanden = X	10 - 100/GF = 2	10 - 100/GF = 2	10 - 100/GF = 2	10 - 100/GF = 2	Vorhanden = X
	> 100/GF = 3	> 100/GF = 3	> 100/GF = 3	> 100/GF = 3	
		3			

4.1.3 Erregeridentifizierung

Die Keimidentifizierung wurde mit der Kombination aus Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation und Massenspektrometer mit Flugzeitanalysator (MALDI TOF MS) durchgeführt.

Bei dem MALDI TOF MS wurde eine einzelne Kolonie aus einer Übernachtskultur mit einem Holzstäbchen auf das Target übertragen und kurz angetrocknet. Anschließend wurde 1 µl Matrix auf die Kolonie pipettiert. Danach wurde das Target in den MALDI Biotyper-Microflex LT 60 eingelegt und analysiert. Das entstandene Massenspektrum wurde in eine Peak-Liste mittels MALDI Biotyper CA System transformiert. Die entstandene Peak-Liste wurde mit Referenz-Peak-Listen der Bruker-Keimdatenbank verglichen und ein log(score) Wert zwischen 0,00 und 3,0 wurde erzeugt [URL-12]. Das Ergebnis mit dem besten Score (> 2,0) wird als der zu identifizierende Keim angenommen.

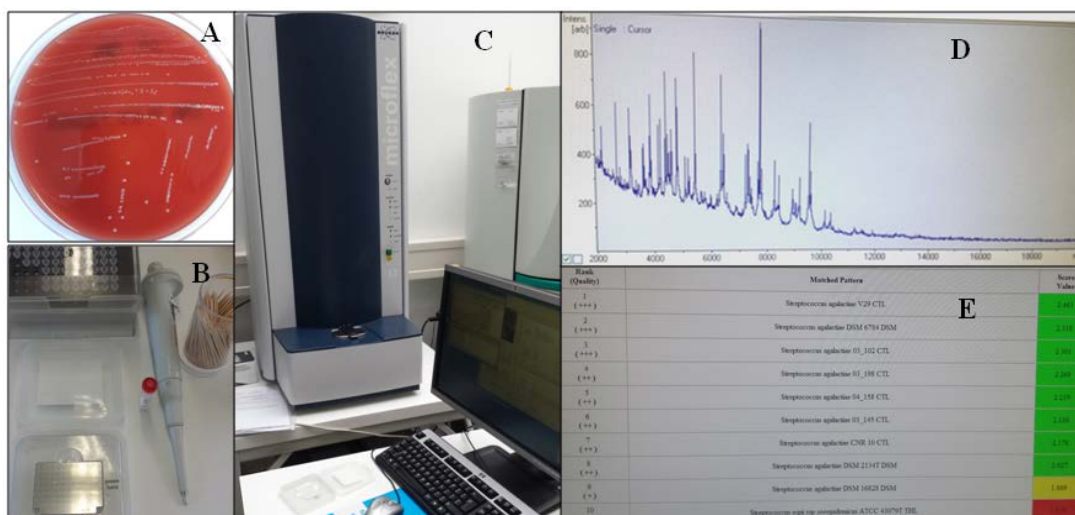


Abbildung 2: Keimidentifizierung mittels MALDI TOF MS

Ein bewachsenes TSS-Nährmedium (Reinkultur) nach 24 h Inkubation mit unbekanntem Keim stellt A dar. B zeigt das Beimpfen des Targets mit einem sterilen Holzstäbchen und der Matrix. Der MALDI TOF MS (Brucker) wird in C präsentiert. Das erhaltene Massenspektrum (D) wird in eine Peak-Liste umgewandelt, mit einer Referenzdatenbank verglichen und als Scoreübersicht (E) der Ergebnisse ausgegeben.

Für eine Plausibilitätsprüfung der Identifizierung von Streptokokken mittels MALDI TOF wurde das Strep Kit von DiaMondial verwendet, welches die unterschiedlichen Gruppen A, B, C, D, F und G der Lancefield-Einteilung der Streptokokken nachweist. Die Analyse der Streptokokken wurde nach der Anleitung des Kits durchgeführt.

Zur Überprüfung des Keimes *Staphylococcus aureus* wurde das Staph Plus Latex Kit nach Anleitung verwendet.

4.1.4 Resistenztestung

Für die Resistenztestung von *Ureaplasma urealyticum* und *Mycoplasma hominis* wurde das Kit S.I.R. Mycoplasma von Bio-Rad nach Anleitung verwendet. Zusätzlich wurde ein SAB-Agar zur Überprüfung von Hefenwachstum verwendet (Inkubation: 36 ± 1 °C, aerob). Die Auswertung erfolgte nach 24 h aerober Bebrütung (36 ± 1 °C).

Des Weiteren standen für die pathogenen Keime zwei Resistenztestungssysteme zur Verfügung. Für Streptokokken wurde das VITEK2-System verwendet. Für alle weiteren Erreger wurde das Phönix-System eingesetzt.

Das VITEK2-System

Mittels VITEK2-System wurden MHK-basierte Antibiotogramme pathogener Streptokokken erstellt. Der zu untersuchende pathogene Keim wurde in 2,5 ml sterile NaCl-Lösung [0,9%] resuspendiert und ein McFarland (MCF) von 0,5 eingestellt. Für die Resistenztestung von Streptokokken wurde die Resistenzkarte AST-ST01 verwendet (siehe Tabelle 10).

Während der Inkubationszeit von ca. 18 h wurde automatisch das Wachstum in den einzelnen Kammern der Resistenzkarte mit dem VITEK2-System gemessen. Daraus wurden die Minimale-Hemmkonzentration-Werte (MHK-Werte) gebildet und das System interpretierte diese (s = sensibel, r = resistent, i = intermediär). Anschließend wurden die Ergebnisse durch das Expert-System des VITEK2-Systems geprüft und für den Nutzer zur Verfügung gestellt.

Tabelle 10: Antibiotika der VITEK2-Resistenzkarte AST-ST01

Abgebildet sind die in der VITEK2-Resistenzkarte AST-ST01 gemessenen Konzentrationen für jedes Antibiotikum.

Antibiotikum	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Ampicillin (AM)	0,5; 1; 4; 8
Benzylpenicillin (P)	0,06; 0,12; 0,5; 2
Cefotaxime (CTX)	0,25; 0,5; 1; 2
Ceftriaxone (CRO)	0,12; 0,25; 1; 4
Clindamycin (CM)	CM 0,12; CM 0,25; CM 0,5; CM/E 0,5/0,1
Erythromycin (E)	1; 2; 4; 16
Induzierte Clindamycin Resistenz (ICR)	CM 0,5; CM/E 0,25/0,5
Levofloxacin (LEV)	1; 2; 4; 16
Linezolid (LNZ)	2; 4
Tetracycline (TE)	0,12; 0,5; 1; 4
Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT)	8/152; 16/304; 64/1216
Vancomycin (VA)	0,5; 1; 2; 4



Abbildung 3: Das VITEK2-System

A zeigt die Impfstation mit Carrier und Resistenzkarte. B stellt das VITEK2-System dar.

Das Phönix-System

Mit dem Mikro-Bouillondilutions Verfahren von BD wurden die Antibiotogramme der pathogenen Erreger erstellt. Zusätzlich zum Antibiotogramm bietet das Phönix-System die Möglichkeit zur Erregeridentifizierung mittels bunter Reihe.

In einem Carrier wurden für jede Probe eine Phoenix AST Broth (8 ml) und eine Phoenix ID Broth platziert. Bei der Verwendung des PMIC-75 Panels wurde zusätzlich noch eine Phoenix AST Broth (4,5 ml) verwendet. Mit einem sterilen Tupfer wurde etwas Material einer Übernachtskultur eines Erregers in die Phoenix AST Bouillon übertragen. Auf einem Carrier können 5 Proben vorbereitet werden. Das Carrier wurde anschließend in das BD Phoenix™ AP System gestellt. Das System misst automatisch den MCF und stellt diesen je nach Anforderung ein. Währenddessen wurden die Panels vorbereitet. Für gramnegative Erreger stehen NMIC-402 und NMIC/ID-402 zur Verfügung. Für grampositive Erreger wurden PMIC-75 und PMIC/ID-88 verwendet. Die Panel NMIC/ID-402 und PMIC/ID-88 wurden zusätzlich für die Keimidentifizierung verwendet. Eine Auflistung der einzelnen Antibiotika mit den dazugehörigen Konzentrationen sind in den Tabellen 11 und 12 einzusehen. Die Panel werden mit den verdünnten Bouillons beimpft und anschließend in den BD Phoenix™ Automated Microbiology System platziert.

Tabelle 11: Antibiotika der Phönix-Panel für gramnegative Organismen
 Abgebildet ist der Konzentrationsbereich [µg/ml] für die einzelnen in dem Panel vorkommenden Antibiotika des Phönix-Systems.

Antibiotikum	NMIC-402 Konzentration [µg/ml]	NMIC/ID-402 Konzentration [µg/ml]
Amikacin (AN)	4 - 16	4 - 16
Amoxicillin/Clavulanate (AXC)	2/2 - 32/2	2/2 - 32/2
Ampicillin (AM)	2 - 8	2 - 8
Cefepime (FEP)	1 - 8	1 - 8
Cefotaxime (CTX)	1 - 4	1 - 4
Ceftazidime (CAZ)	0,5 - 8	0,5 - 8
Cefuroxime (CXM)	2 - 8	2 - 8
Ciprofloxacin (CIP)	0,25 - 1	0,25 - 1
Colistin (CL)	1 - 4	1 - 4
Ertapenem (ETP)	0,25 - 1	0,25 - 1
Fosfomycin (FF)	16 - 64	16 - 64
Gentamicin (GM)	1 - 4	1 - 4
Imipenem (IPM)	0,25 - 8	0,25 - 8
Levofloxacin (LVX)	0,5 - 2	0,5 - 2
Meropenem (MEM)	0,125 - 8	0,125 - 8
Piperacillin (PIP)	4 - 16	4 - 16
Piperacillin/Tazobactam (TZP)	4/4 - 16/4	4/4 - 16/4
Tigecycline (TGC)	0,5 - 2	0,5 - 2
Tobramycin (NN)	1 - 4	1 - 4
Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT)	1/19 - 4/76	1/19 - 4/76
ESBL (ESBL)	-	-
Cefuroxime/Clavulanate (ESBL)	< 9	< 9
Ceftazidime/Clavulanate (ESBL)	< 9	< 9
Cefpodoxime-proxetil (ESBL)	< 9	< 9
Ceftazidime (ESBL)	< 9	< 9
Ceftriaxone/Clavulanate (ESBL)	< 9	< 9

Tabelle 12: Antibiotika der Phönix-Panel für grampositive Organismen
 Abgebildet ist der Konzentrationsbereich [µg/ml] für die einzelnen in dem Panel vorkommenden Antibiotika des Phönix-Systems.

Antibiotikum	PMIC-75 Konzentration [µg/ml]	PMIC/ID-88 Konzentration [µg/ml]
Ampicillin (AM)	0,0625 - 32	2 - 8
Cefoxitin (FOX)	2 - 8	2 - 8
Ceftaroline (CPT)	/	0,125 - 1
Chloramphenicol (C)	1 - 16	/
Ciprofloxacin (CIP)	/	0,5 - 4
Clindamycin (CC)	0,25 - 2	0,25 - 1
Daptomycin (DAP)	0,25 - 4	0,5 - 4
Erythromycin (E)	0,25 - 4	0,25 - 2
Fosfomycin (FF)	16 - 64	16 - 64
Fusidic Acid (FA)	0,5 - 8	0,5 - 8
Gentamicin (GM)	1 - 4	1 - 4
Gentamicin-Synergy (GMS)	500	500
Imipenem (IPM)	1 - 8	2 - 8
Inducible macrolide resistance test (ECC)	POS/NEG	POS/NEG
Kanamycin (K)	4 - 16	/
Kanamycin-Syn (KS)	250	/
Levofloxacin (LVX)	0,25 - 4	/
Linezolid (LZD)	0,5 - 4	0,5 - 4
Beta-Lactamase (Nitrocefin-based, NCF)	/	POS/NEG
Moxalactam (MOX)	2 - 16	/
Moxifloxacin (MXF)	0,25 - 2	0,25 - 1
Mupirocin (MUP)	0,5 - 8	/
Mupirocin -High Level (MUH)	256	256
Nitrofurantoin (FM)	16 - 64	16 - 64
Oxacillin (OX)	0,25 - 2	0,25 - 2

Penicillin (P)	0,0625 - 0,25	0,0625 - 0,25
Pristinamycin (PR)	0,25 - 2	/
Quinupristin/Dalfopristin (SYN)	0,5 - 4	/
Rifampin (RA)	0,25 - 16	0,25 - 1
Teicoplanin (TEC)	0,5 - 8	0,5 - 8
Tetracycline (TE)	0,5 - 2	0,5 - 2
Tigecycline (TGC)	/	0,25 - 1
Tobramycin (NN)	1 - 4	/
Trimethoprim (TMP)	0,5 - 4	/
Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT)	0,5/9,5 - 4/76	1/19 - 4/76
Vancomycin (VA)	0,5 - 8	0,5 - 8

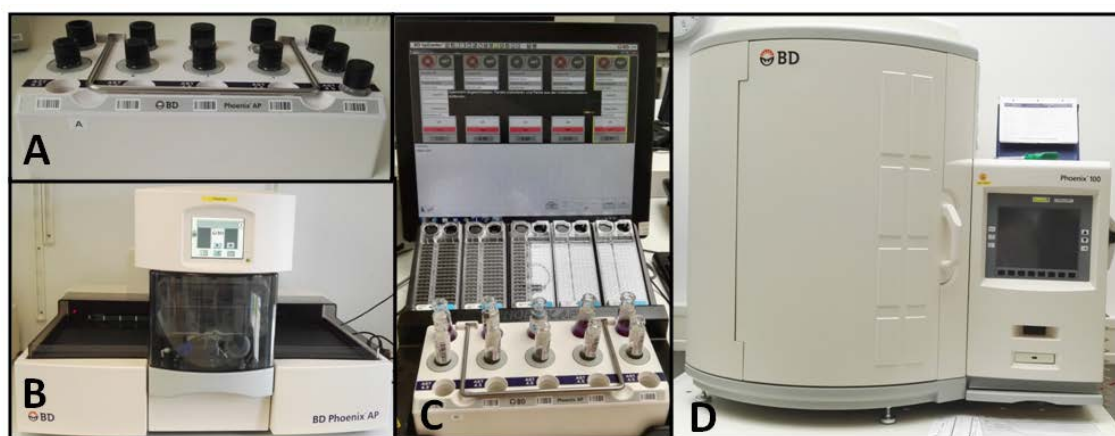


Abbildung 4: Das Phönix-System

A zeigt das Carrier für 5 Proben mit der Phoenix AST Broth (8 ml) und der ID Broth. Die 5. Probe besitzt zusätzlich noch eine Phoenix AST Broth (4,5 ml). Das BD Phoenix™ AP System ist bei B dargestellt. Nach dem zuweisen der Panel zum zugehörigen Patient werden die Bouillons in die passenden Panel überführt (C). D bildet das BD Phoenix™ Automated Microbiology System dar.

Nach einer Inkubationszeit von ca. 18 h wurde automatisch das Wachstum in den Mikrotiterplatten der verschiedenen Panel gemessen. Die daraus resultierenden MHK-Werte wurden von dem BD Phoenix™ Automated Microbiology System interpretiert (s = sensibel, r = resistent, i = intermediär). Anschließend wurden die Ergebnisse durch das BD EpiCenter™ Microbiology Data Management System geprüft und für den Nutzer zur Verfügung gestellt.

4.2 Molekularbiologisches Verfahren

4.2.1 Nukleinsäure-Hybridisierung Affirm-Test

Für den Nachweis von *Trichomonas vaginalis* wurde der mikrobiologische Identifizierungstest Affirm VP III von BD nach Anleitung verwendet. Neben den *Trichomonas vaginalis* wurden auch *Candida*-Spezies und *Gardnerella vaginalis* nachgewiesen.

Dieses Verfahren wurde nur angewendet, wenn der Verdacht auf diese Erreger vom Einsender (Facharzt) angegeben wurde.



Abbildung 5: BD Affirm™ VP III

Zu sehen ist das Gerät (BD Affirm™ VP III) zur Überprüfung auf *Trichomonas vaginalis*, *Candida*-Spezies und *Gardnerella vaginalis* mit 6 verschiedenen Proben.

Bei einer sichtbaren Blaufärbung der Perle auf dem jeweiligen Zielorganismus kann das Ergebnis als positiv bewertet werden. Die Abwesenheit einer Färbung ist ein negatives Testergebnis. Neben der Färbung der Perlen des Zielorganismus zeigen zwei Kontrollfelder an, ob der Test funktioniert hat oder nicht. Das Kontrollfeld „+“ sollte immer eine Blaufärbung aufweisen, da sonst der Test nicht funktioniert hat und

wiederholt werden sollte. Bei einer Blaufärbung des Kontrollfeldes „-“ muss der Test wiederholt werden, da dieser nicht erfolgreich war.

4.2.2 DNA Extraktion

Für die DNA Extraktion wurde für jede Probe 1000 µl Ampuwa® Spüllösung vorgelegt. Der Tupfer des Abstriches wurde abgeschnitten und in ein Eppendorf Cup mit der Spüllösung platziert. Anschließend wurde dies für 1 h im Labexchange ausgeschüttelt.

Die DNA Extraktion dient zur Isolierung der Ziel-DNA, falls diese vorhanden ist. Die isolierte DNA wird für die Multiplex Real-Time PCR benötigt. Für die DNA Extraktion wurde das Kit High Pure PCR Template Preparation von Roche nach Anleitung verwendet. Es wurden 2 µl interne Kontrolle (IC) für jede Probe eingesetzt. Am Ende der Aufreinigung wurden 60 µl Elutionspuffer verwendet.

4.2.3 Multiplex Real-Time PCR

Die Multiplex Real-Time PCR Urethritis plus von fast-track wurde für die Identifizierung von *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* und *Ureaplasma parvum* verwendet.

Die Tabelle 13 zeigt das Pippetierschema für den Master Mix. Dieser wurde pro Lauf zweimal hergestellt. Einmal für den PPMix 1 und einmal für den PPMix 2.

Tabelle 13: Master Mix

Diese Tabelle zeigt das Pippetierschema für den Mastermix.

Chemikalien	Master Mix (1x)	Master Mix (64x)
Puffer	12,5 µl	800 µl
PPMix	1,5 µl	96 µl
Enzym	1 µl	64 µl
Gesamt	15 µl	960 µl

In dem Panel für die PCR wurden je 15 µl Master Mix vorgelegt und 10 µl Patientenprobe (bzw. positiv und negativ Kontrolle) dazu gegeben. Jeder Lauf muss eine positiv und eine negativ Kontrolle enthalten.

Tabelle 14: Parameter für den Lightcycler 480

Diese Tabelle zeigt die nötigen Einstellungen für den LightCycler 480.

Schritt	Temperatur	Zeit
Aktivierung	42 °C	15 min
Denaturierung	94 °C	3 min
40 Zyklen:		
Amplifikation	94 °C	8 sec
	60 °C	34 sec

Für die PCR wurde der LightCycler® 480 Instrument II von Roche verwendet. Die notwendigen Parameter sind in der Tabelle 14 zu erkennen. Die LightCycler® 480 Software diente zur Auswertung der Resultate. Für die Analyse der Ergebnisse wurden die Kalibrierfarbstoffe der FTD color compensation zugeschaltet.

4.2.4 TMA Panther® (Hologic|Gen-Probe)

Der Vollautomat Panther® (Hologic|Gen-Probe) wurden für den Nachweis von *Chlamydia trachomatis* (CT) und *Neisseria gonorrhoeae* (NG) genutzt. Dazu wurden 500 µl der ausgeschüttelten Proben (siehe 4.2.2) verwendet. Das „Aptima Combo 2 for CT/NG assay“ wurde nach Anleitung für die Testung verwendet.



Abbildung 6: Vollautomat Panther® (Hologic|Gen-Probe) [URL-17]

Dargestellt ist der Vollautomat Panther® der Firma Hologic. Gen-Probe Assays werden genutzt für Nukleinsäure-Amplifikationstests.

Dieses Verfahren wurde nur angewendet, wenn der Verdacht auf diese Erreger vom Einsender (Facharzt) angegeben wurde.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Mikroskopie

Die mikroskopische Gramfärbung dient zur vorläufigen Beurteilung der bakteriellen Vaginose und zur Einschätzung ob der vorliegende Vaginalabstrich gesund ist oder nicht. Allerdings kann anhand der Mikroskopie keine Aussage über mögliche Erreger getroffen werden, sondern nur ein Überblick über die vorhandenen Keimgruppen und die Zellbestandteile gegeben werden. Die Präparate wurden nach der Gramfärbung bei 1.000-facher Vergrößerung betrachtet.

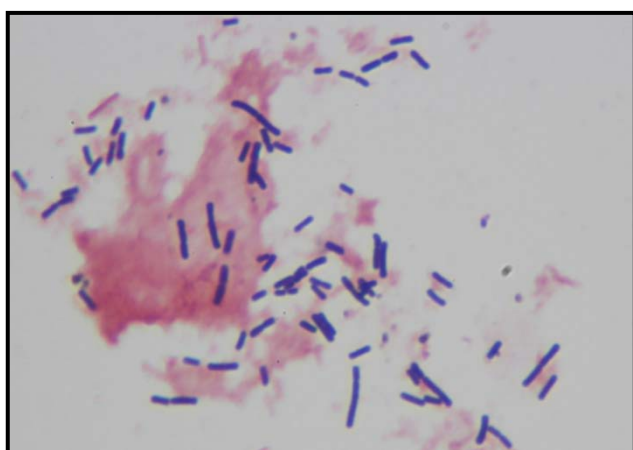


Abbildung 7: Gesunder Vaginalabstrich

Diese Abbildung zeigt einen gesunden Vaginalabstrich nach der Gramfärbung mit grampositiven Laktobazillen (violette Stäbchen).

Die Abbildung 7 ist ein Beispiel für einen gesunden Vaginalabstrich. Es sind viele Laktobazillen zu erkennen, welche Bestandteil der Normalflora sind. Neben den grampositiven Laktobazillen ist Detritus zu erkennen. Dies sind zelluläre Zerfallsprodukte und gehören ebenso zu einem normalen Vaginalabstrich.

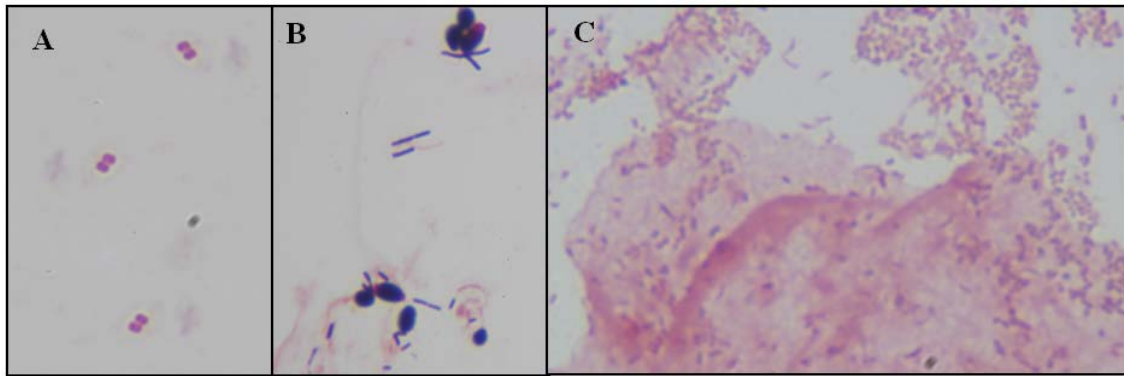


Abbildung 8: Drei auffällige Vaginalabstriche

Diese Abbildung zeigt drei verschiedene auffällige Vaginalabstriche nach der Gramfärbung. A: Gonorrhö; B: Pilzinfektion; C: Bakterielle Vaginose

Die Abbildung 8 zeigt drei unterschiedliche auffällige Grampräparate von Vaginalabstrichen. Das erste Präparat (A) zeigt die typischen semelförmigen Diplokokken der *Neisseria gonorrhoeae* und weist auf die Erkrankung Gonorrhö hin. Dies ist ein typisches Bild bei dieser Krankheit, da die komplette Normalflora fehlt. Das zweite Präparat (B) zeigt eine Pilzinfektion. Neben den Laktobazillen und Detritus sind deutlich Sprosspilze zu sehen. Anhand des Präparates kann keine Identifizierung der genauen Spezies vorgenommen werden. Dafür sind die kulturellen Nachweismethoden notwendig. Das dritte Präparat (C) liefert einen Verdacht auf eine bakterielle Vaginose. In diesem Präparat sind keine Laktobazillen zusehen, aber negative Stäbchen und Epithelzellen, welche clue cells bilden. Clue cells (Schlüsselzellen) sind Epithelzellen, die an ihrer Oberfläche mit einem Bakterienrasen überzogen sind [Harmanli *et al.*, 2000]. Bei einem solchen Präparat fällt der Nugent-Score besonders hoch aus und unterstützt den Verdacht auf eine bakterielle Vaginose. Mithilfe des Kulturmediums lässt sich dazu eine eindeutige Aussage treffen.

Es wurden insgesamt 251 Proben mikroskopiert und hinsichtlich Zellbestandteilen und Keimarten beurteilt. Die zusammengefassten Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Mikroskopische Ergebnisübersicht

Diese Tabelle stellt die Erregerübersicht für die mikroskopische Bewertung der Zellbestandteile und Keimarten dar.

Zellbestandteile			Keimarten		
Detritus	Leukozyten	Epithelien	Grampositive Kokken	Coryneforme Stäbchen	Sprosszellen
Nicht vorhand en 7 Proben	Nicht vorhand en < 10/GF 118 Proben	Nicht vorhand en < 10/GF 93 Proben	Nicht vorhand en < 10/GF 69 Proben	Nicht vorhand en < 10/GF 14 Proben	Nicht vorhand en 222 Proben
Vorhan- den 244 Proben	10 - 100/GF = 46 Proben	10 - 100/GF = 95 Proben	10 - 100/GF = 26 Proben	10 - 100/GF = 3 Proben	Vorhand en 29 Proben
	> 100/GF= 15 Proben	> 100/GF= 55 Proben	> 100/GF= 3 Proben	> 100/GF= 0 Proben	

Bei der Mikroskopie wurden die Zellbestandteile und die Keimarten bestimmt. Zu den Zellbestandteilen zählen Detritus, Leukozyten und Epithelien. Der Detritus ist Zell- und Gewebeabfall, welcher bei der Nekrose von Zellen entsteht. Die Bestimmung der Leukozyten und Epithelzellen kann einen Hinweis auf mögliche Infektionen geben. Bei einer erhöhten Anzahl von Leukozyten könnte eine Infektion vorliegen [Donders; 2004]. Zu den bestimmenden Keimarten zählen grampositive Kokken und coryneforme Stäbchen. Dies bietet die Möglichkeit zu einer Einschätzung, ob eine Infektion vorliegt oder nicht. Zu den grampositiven Kokken zählen u.a. *Streptococcaceae* und *Staphylococcaceae*. Coryneforme Stäbchen kommen beim Menschen als Normalflora vor. Neben den Kokken und Stäbchen können auch Sprosszellen mikroskopisch detektiert werden. Hefezellen lassen sich aufgrund ihrer Größe und den typischen Sprossungsstellen gut von den grampositiven Mikroorganismen unterscheiden. Außerdem lassen sich gramnegative Stäbchen erkennen. Diese werden allerdings bei dem Nugent-Score angegeben. Zu den gramnegativen Stäbchen gehören u.a. *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides* oder *Prevotella*.

Bei 250 Proben wurde eine Beurteilung des Nugent-Scores vorgenommen. Die eine nicht bewertete Probe verlangte nur eine Überprüfung auf *Neisseria gonorrhoeae*, so

dass in diesem Fall eine Bewertung des Nugent-Score nicht notwendig gewesen ist. Die Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse des Nugent-Scores.

Tabelle 16: Ergebnisübersicht des Nugent-Scores

Diese Tabelle zeigt die Ergebnisübersicht des Nugent-Scores von 250 Patientenproben.

Laktobazillen	Gramnegative Stäbchen / Gardnerellen	Gebogene Stäbchen
> 30/GF = 69 Proben	0/GF = 79 Proben	0/GF = 242 Proben
6 - 30/GF = 78 Proben	< 1/GF = 36 Proben	< 1 - 5/GF = 5 Proben
1 - 5/GF = 40 Proben	1 - 5/GF = 64 Proben	> 6/GF = 3 Proben
< 1/GF = 31 Proben	6 - 30/GF = 39 Proben	Clue cells nicht vorhanden = 229 Proben
0/GF = 32 Proben	> 30/GF = 32 Proben	Clue cells vorhanden = 21 Proben

Die Tabelle 17 zeigt die ausgewerteten Daten des Nugent-Score der 250 Proben. Gleichzeitig ist auch die Bewertung hinsichtlich einer bakteriellen Vaginose zu sehen.

Tabelle 17: Mikroskopische Bewertung hinsichtlich des Nugent-Scores

Diese Tabelle zeigt die mikroskopischen Ergebnisse der 250 Proben nach der Bewertung hinsichtlich des Nugent-Scores. (Z = clue cells vorhanden)

Punktzahl	Bewertung	Anzahl der Proben
0 - 3 Punkte	Negativ	137
4 - 6 Punkte	Intermediär	81
4 - 6 Punkte + Z	Intermediär	9
Ab 7 Punkte	Positiv	23

Mit Hilfe der Tabelle 17 kann bestimmt werden wie oft eine bakterielle Vaginose aus mikroskopischer Sicht vorkommt. Für 137 Proben wurde ein negatives Ergebnis ermittelt. Bei 20 Proben konnte eine bakterielle Vaginose anhand der Mikroskopie vorausgesagt werden. Die 92 intermediären Proben lieferten keine Aussage zu einer bakteriellen Vaginose. Zur Überprüfung bzw. Widerlegung der Mikroskopie erfolgte der kulturelle Nachweis.

5.2 Darstellung der kulturell nachgewiesenen Erreger

Es wurden 251 Proben (Vaginalabstriche) untersucht. Diese wurden nach je 24 und 48 h betrachtet und die Erreger identifiziert. Die nachgewiesenen Erreger sind in der Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 18: Ergebnisübersicht der nachgewiesenen kulturell an gezüchteten Erreger
Diese Tabelle listet die kulturell identifizierten Mikroorganismen zusammen mit ihrer Häufigkeit auf.

Erreger	Vorkommen in den Proben
Laktobazillen	215
• Döderlein-Bakterien	89
• Keine Döderlein-Bakterien	14
<i>Gardnerella vaginalis</i>	60
<i>Candida albicans</i>	54
<i>Candida</i> -Spezies	5
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	45
<i>Escherichia coli</i>	13
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	60
<i>Mycoplasma hominis</i>	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	7
<i>Enterococcus faecalis</i>	8
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4
Standortflora	150

Der MRS-Agar mit HRP diente zur Einteilung der Laktobazillen in Döderlein-Bakterien und keine Döderlein-Bakterien. Dieser Agar wurde als Methodenerweiterung während der Arbeit eingeführt. Es wurden 114 Vaginalabstriche auf dem MRS-Agar mit HRP ausgestrichen. Kam es zu einem Wachstum, konnte anhand der Blaufärbung bestimmt werden, ob es sich um Döderlein-Bakterien handelt oder nicht. Es wurden 89 Döderlein-Bakterien nachgewiesen. Bei 14 Proben erwiesen sich die Laktobazillen als keine Döderlein-Bakterien. Bei vier Proben konnten beide Arten von Döderlein-Bakterien identifiziert werden.

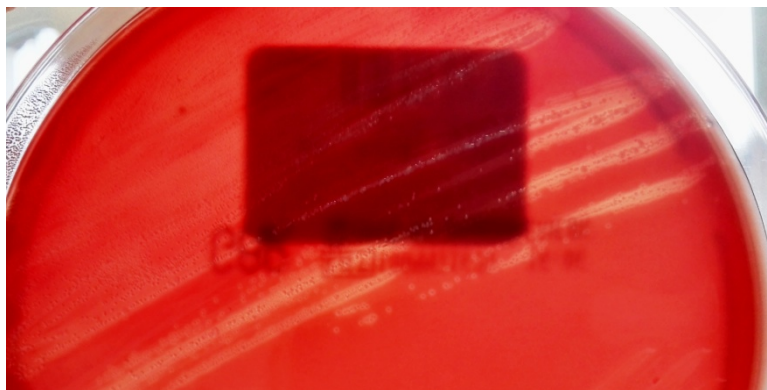


Abbildung 9: Nachweis einer bakteriellen Vaginose auf dem GAR-Agar nach 48 h Bebrütung
Dargestellt ist ein GAR-Agar nach 48 h Bebrütung. Die ausgeprägte Hämolyse und das zarte Wachstum sind ein eindeutiger Hinweis auf *Gardnerella vaginalis*.

Eine bakterielle Vaginose (Abbildung 9) wurde in 60 Fällen kulturell nachgewiesen. Eine Pilz-Infektion mit *Candida albicans* oder anderen *Candida*-Spezies war in 59 Proben der Auslöser. Gonorrhö wurde 2-mal nachgewiesen. B-Streptokokken wurden in 45 Vaginalabstrichen nachgewiesen. Urogenitale Myko- und Ureaplasmen wurden in 68 Proben nachgewiesen. Der Keim *Staphylococcus aureus* wurde in 7 Fällen identifiziert. Es wurden verschiedene Keime der Stuhlflora nachgewiesen. Darunter zählen *E. coli*, *E. faecalis* und andere Keime, welche unter „Standortflora“ zusammengefasst wurden. Zu den Keimen der Standortflora können gehören: koagulase-negative Staphylokokken, *Staphylococcus lugduensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Anaerococcus vaginalis*, *Enterococcus cloacae*, *Bacteroides stercoris*, sowie grampositive Hautflora oder gramnegative Stäbchen.

5.3 Ergebnisse der Resistenztestung

Es wurden zu allen pathogenen Vaginitis Erregern mit der Software Hybase 6 Statistik der Tieto Deutschland GmbH eine Resistenzstatistik erstellt. Dazu wurden alle in das „Diagnosticum“ eingesendeten Vaginal-Abstriche zur Untersuchung auf pathogene Keime verwendet. Eine Auswahl der Erreger sowie der Antibiotika wird im Folgenden dargestellt. Die kompletten Antibiogramme sind im Anhang einzusehen (Tabellen 34 - 40). Die Interpretation der MHK-Werte erfolgte nach EUCAST Norm [EUCAST, 2014].

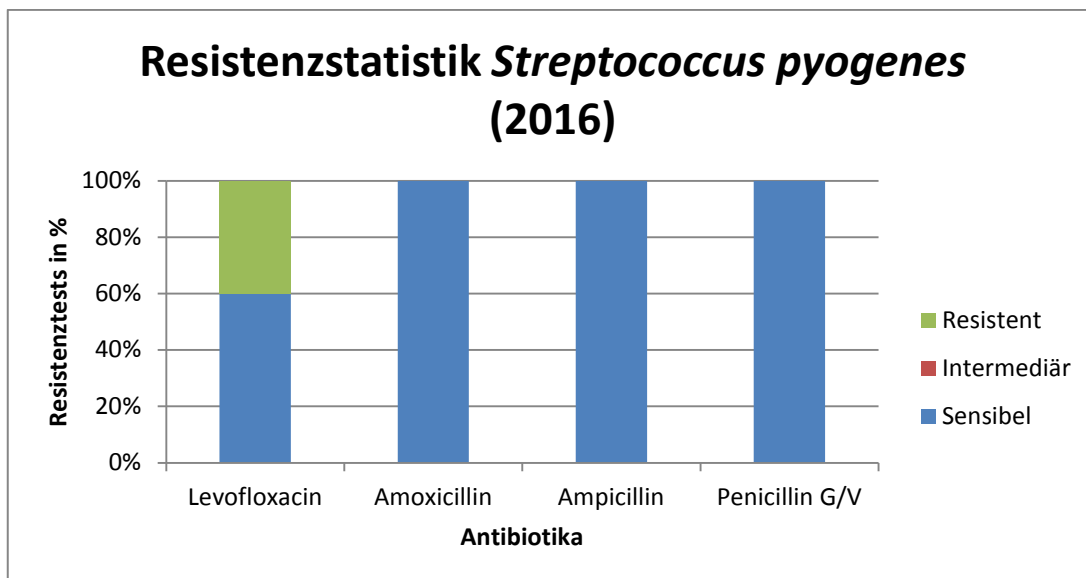


Abbildung 10: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) ausgewählter Antibiotika von *Streptococcus pyogenes* (n = 5) im zweiten Quartal von 2016.

Die Abbildung 10 zeigt die Resistenzstatik ausgewählter Antibiotika des Erregers *Streptococcus pyogenes*. Dieser pathogene Keim wird bei Nachweis immer behandelt. Als Medikament der Wahl zählen Penicilline aus der Gruppe der β -Lactam-Antibiotika [Darai *et al.*, 2012]. In dem zweiten Quartal von 2016 konnte von den fünf detektierten A-Streptokokken keine Resistenz gegenüber den verschiedenen Penicillinen (Amoxicillin, Ampicillin und Penicillin G/V) festgestellt werden. *Streptococcus pyogenes* war zu 40 % resistent gegenüber Levofloxacin, ein Antibiotikum aus der Gruppe der Fluorchinolone.

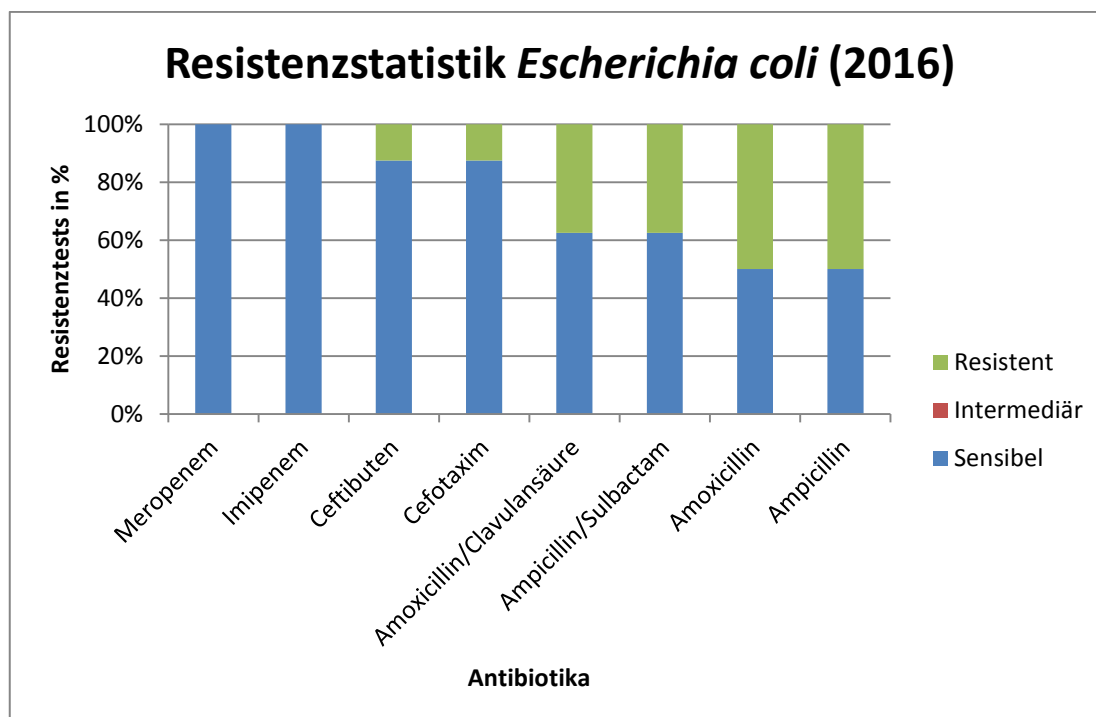


Abbildung 11: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) ausgewählter Antibiotika von *Escherichia coli* (n = 8) im zweiten Quartal von 2016.

Von den insgesamt 13 nachgewiesenen *Escherichia coli* wurden in acht Fällen aufgrund der hohen Konzentration im Untersuchungsmaterial ein Antibiotogramm erstellt. Für die Behandlung von *Escherichia coli* sollte in jedem Fall das Antibiotogramm hinzugezogen werden, da sich mittlerweile viele Resistente Stämme ausgebildet haben. Zu den am häufigsten zur Therapie verwendeten Medikamenten zählen Aminopenicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Chinolone [Darai *et al.*, 2012]. In der Abbildung 11 ist zu erkennen, dass die beiden Carbapeneme, Meropenem und Imipenem, komplett sensibel gegenüber *Escherichia coli* sind. Die Cephalosporine, Ceftributen (12,5 %) und Cefotaxim (12,5 %), weisen nur eine geringe Resistenz auf. *Escherichia coli* ist zu 50 % resistent gegenüber den Aminopenicillinen, Amoxicillin und Ampicillin. Die Sensibilität lässt sich leicht erhöhen, wenn die Aminopenicilline mit den β -Lactam-Inhibitoren Clavulansäure bzw. Sulbactam versetzt werden. Die Resistenzen sinken bei den Kombinationspräparaten (Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam) von 50 % auf 37,5 %.

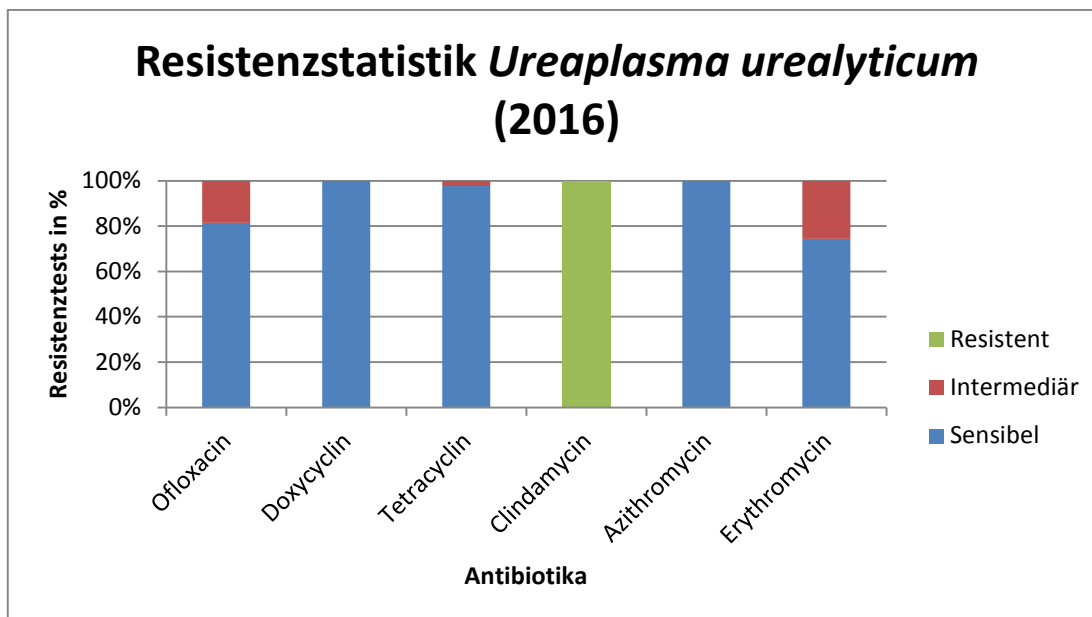


Abbildung 12: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) ausgewählter Antibiotika von *Ureaplasma urealyticum* (n = 43) im zweiten Quartal von 2016.

Kulturell konnten 60 *Ureaplasma urealyticum* mit dem Kit MYCOPLASMA DUO (Bio-Rad) nachgewiesen werden. Davon wurden in 43 Fällen eine Resistenztestung durchgeführt (Abbildung 12). Der Erreger ist zu 100 % sensibel gegenüber dem Mittel der Wahl, Doxycyclin. Weiterhin ist Azithromycin, aus der Gruppe der Makrolide, zu 100 % wirksam. *Ureaplasma urealyticum* ist komplett resistent gegenüber Clindamycin. Der Erreger weist gegenüber den anderen getesteten Antibiotika (Ofloxacin: 18,06 %, Tetracyclin: 2,33 %, Erythromycin: 25,58 %) geringe intermediäre Wirksamkeit auf.

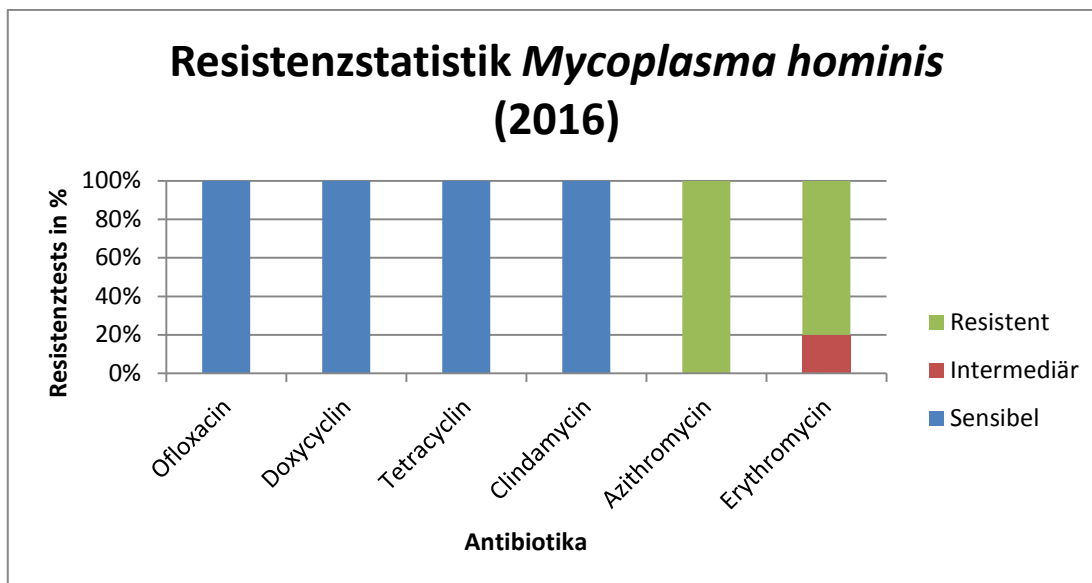


Abbildung 13: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) ausgewählter Antibiotika von *Mycoplasma hominis* (n = 5) im zweiten Quartal von 2016.

Die Abbildung 13 zeigt die Resistenzstatistik des Erregers *Mycoplasma hominis*. Von insgesamt 8 nachgewiesenen Erregern, konnte in 5 Fällen ein Antibiotogramm erstellt werden. Azithromycin (100%) und Erythromycin (80 %) sind unwirksam gegenüber *Mycoplasma hominis*. Die Antibiotika Ofloxacin, Doxycyclin, Tetracyclin und Clindamycin eignen sich zur Behandlung einer Mykoplasma-Infektion, wobei Doxycyclin das Mittel der Wahl darstellt [Stille *et al.*, 2013]. Da Tetracycline sich während der Schwangerschaft an die Calciumionen in Zahnanlagen und Knochen anlagern können, wird für die Schwangerschaft Clindamycin anstatt Doxycyclin empfohlen [URL-14].

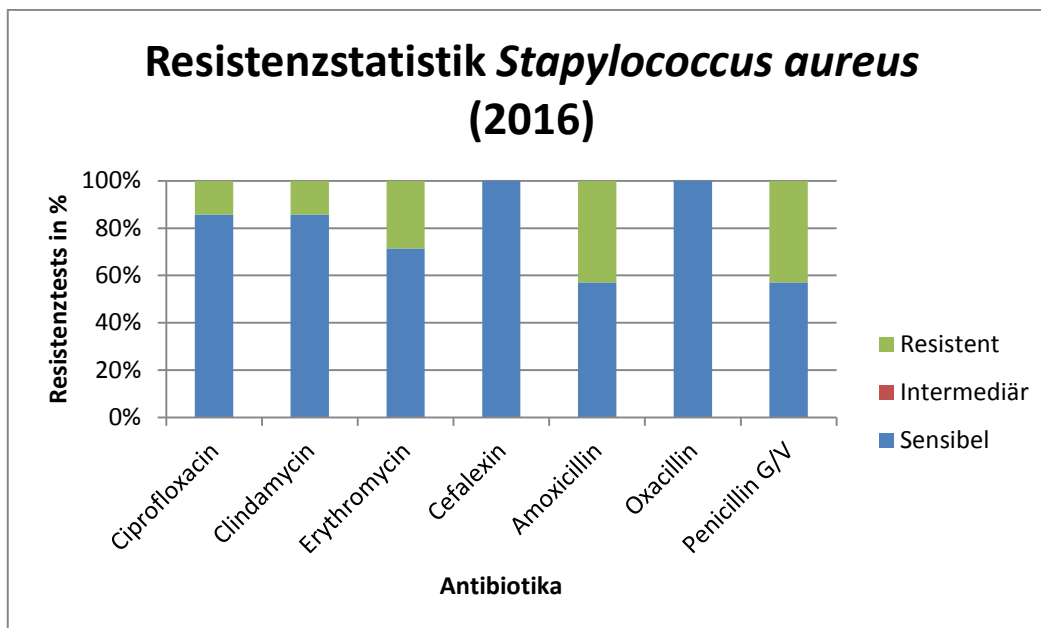


Abbildung 14: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) ausgewählter Antibiotika von *Staphylococcus aureus* (n = 7) im zweiten Quartal von 2016.

Für die Behandlung einer *Staphylococcus aureus* Infektion ist ein Antibiotogramm (Abbildung 14) essentiell, da dieser Keim viele Resistenzen aufweist. Zur Behandlung dieser Infektion werden Penicillinase-feste Penicilline wie Oxacillin oder Kombinationen aus beispielsweise Cephalosporinen mit Clindamycin empfohlen [Stille *et al.*, 2013]. *Staphylococcus aureus* wurde zu 100 % als sensibel gegenüber Cefalexin (Cephalosporin) und Oxacillin getestet. Die anderen getesteten Antibiotika, Ciprofloxacin (14,29 %), Clindamycin (14,29 %), Erythromycin (28,57 %), Amoxicillin (42,86 %) und Penicillin G/V (42,86 %), waren zum Teil unwirksam gegenüber *Staphylococcus aureus*.

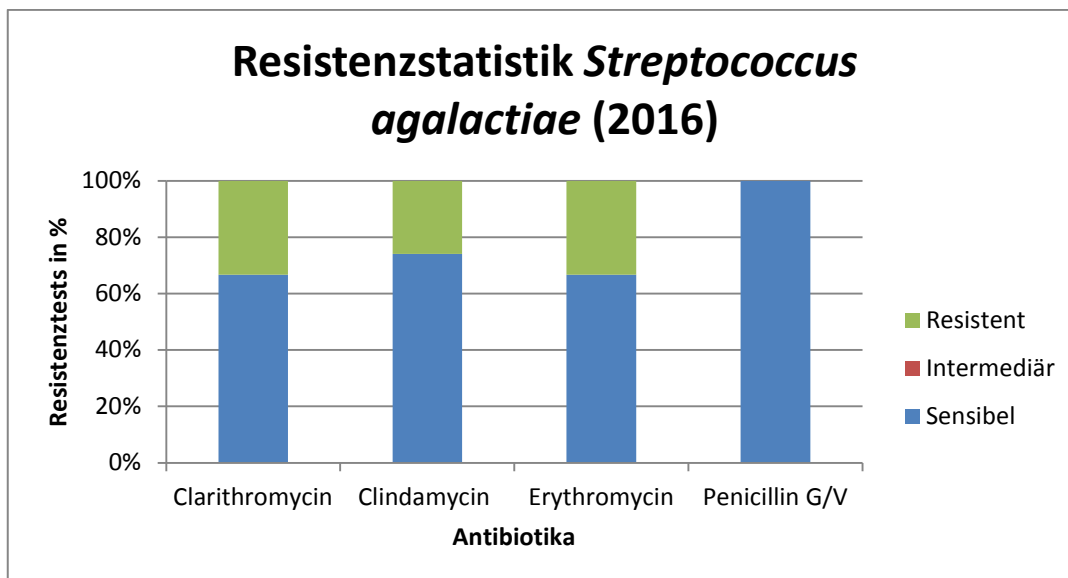


Abbildung 15: Resistenzstatistik (MHK-Interpretation nach EUCAST) ausgewählter Antibiotika von *Streptococcus agalactiae* (n = 27) im zweiten Quartal von 2016.

Die Abbildung 15 zeigt die Resistenzstatistik ausgewählter Medikamente zur Behandlung einer Streptokokken Infektion. Es wurden von den 44 detektierten *Streptococcus agalactiae* Proben in 17 Fällen eine Resistenztestung durchgeführt. Als Mittel der Wahl zählt Penicillin G/V [Leitlinie S2k + IDA AWMF, 2012]. Dieses Antibiotikum wurde in 100 % als wirksam getestet (Abbildung 15). B-Streptokokken waren zum Teil resistent gegenüber den anderen getesteten Medikamenten (Clarithromycin: 33,33 %, Clindamycin: 25,93 %, Erythromycin: 33,33 %). Eine induzierte Clindamycin-Resistenz konnte in zwei Proben festgestellt werden.

5.4 Nachweis der Erreger mittels Multiplex Real-Time PCR

Für die Auswertung der Multiplex Real-Time PCR wurde die LightCycler® 480 Software verwendet. Eine Darstellung der Parameter zeigt die Abbildung 16. Zu den Parametern zählen unter anderem die Zyklen und der verwendete Panel-Typ. Die Filterkombination listet die angewendeten Farbstoffe auf. Der „melt factor“ und der „quant factor“ werden zum extrapolieren der End-Fluoreszenzintensität genutzt, welches auf den Anfangswert zu Beginn der Reaktion basiert. Diese kalkulierte End-Fluoreszenz wird genutzt, um die optimale Integrationszeit fest zusetzen. Die „maximum integration time“ ist auf 2 Sekunden von Roche festgesetzt und stellt die Messzeit der Filterkombinationen dar.

Programs:

1: Aktivierung

1 cycle(s)

None

2: Denaturierung

1 cycle(s)

None

3: Amplifikation

40 cycle(s)

Quantification

Block type: 96 wells (silver)

Detection format:

Name: NEW CC FTD 10,2

Integration time mode: Dynamic

Filter combinations:

Active

Name

Melt factor

Quant factor

Max integration time

Yes

FAM

1

10

2 second(s)

Yes

YD

1

10

2 second(s)

Yes

ROX

1

10

2 second(s)

Yes

Cy5

1

10

2 second(s)

Analysis modules:

1: Abs Quant/2nd Derivative Max for All Samples (of type "Abs Quant/2nd Der")

Created on: 09.05.2016 10:47:00

Created by: System Admin

Last modified on: 28.06.2016 10:37:40

Last modified by: System Admin

Abbildung 16: Übersicht der Analyseparameter der Real-Time PCR

Vor der Analyse des Experimentes wird eine Übersicht der eingestellten Parameter bereit gestellt. Diese enthält zum Beispiel den verwendeten Panel Typ oder das Programm. Anhand der Filterkombinationen kann abgelesen werden welche Farbstoffe zum Einsatz gekommen sind.

Die Abbildung 17 zeigt die vier verwendeten Ablesekanäle, welche für die Analyse verwendet wurden. Zusätzlich wurde die Color Compensation als Analysenhilfe zugeschaltet (Abbildung 18).

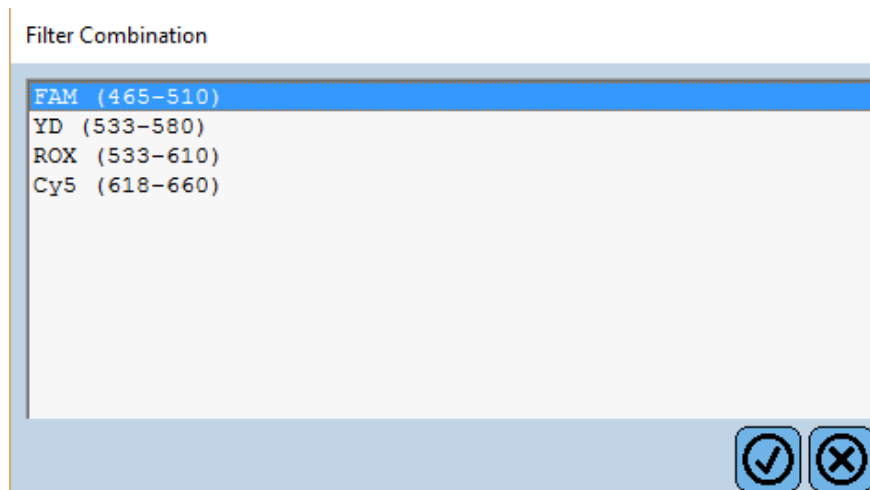


Abbildung 17: Darstellung der vier Ablesekanäle der Multiplex Real-Time PCR

Diese Ablesekanäle wurden verwendet, um die unterschiedlichen Erreger in einer Kapillare nachweisen zu können. Der FAM (carboxy fluorescein) Farbstoff kann bei Wellenlänge von 465 - 510 nm detektiert werden. Der zweite Kanal mit dem YD (yellow dye) Farbstoff deckt den Bereich von 533 - 580 nm ab. Eine Wellenlänge von 533 - 610 nm kann mit dem ROX (6-carboxy-X-rhodamine) Farbstoff erreicht werden. Der Cy5 (cyanine 5) Farbstoff kann in einem Wellenlängenbereich von 618 - 660 nm nachgewiesen werden.

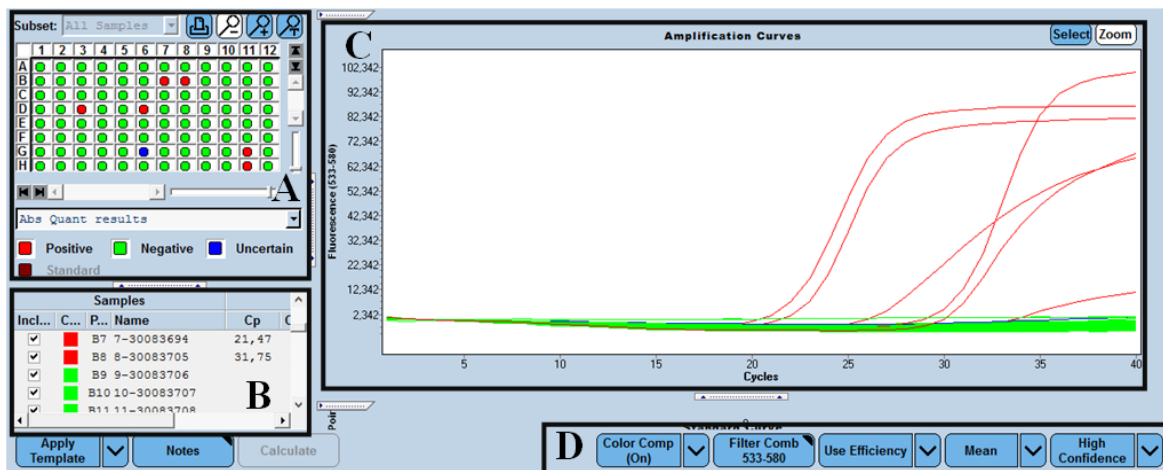


Abbildung 18: Analysenübersicht der PCR

Die Belegung der einzelnen Proben auf dem Panel ist in A dargestellt. B zeigt die Proben mit ihren Namen, sowie den dazugehörigen „crossing point“ (Cp). Die Amplifikationskurve ist in C abgebildet. In dem Diagramm wird die Fluoreszenz gegen die Zyklen aufgetragen. Bei D lassen sich verschiedene Einstellungen zur Analyse vornehmen.

Mit Hilfe der Analysensoftware von LightCycler 480 konnten die Proben in positiv (Erregernachweis) und negativ (kein Erregernachweis) eingeteilt werden. Die Abbildung 18 veranschaulicht dies. Durch die Belegung auf dem Panel (Abbildung 18 A) kann eine Zuordnung der einzelnen Proben stattfinden. In die Reihen A, C, E und G wurden jeweils der PPMix 1 pipettiert. Analog wurde der PPMix 2 für die anderen Reihen verwendet. Die Patientenprobe wurde zu PPMix 1 und 2 dazu gegeben, so dass A1 und B1 ein Patient darstellt. Die farbliche Darstellung des Ergebnisses erleichtert die Auswertung der Proben. Nichtsdestotrotz sollten unklare Proben genauer untersucht werden. Auf den letzten Kapillaren des Panels wurden jeweils die positiv Kontrolle (G11 und H11) und die negativ Kontrolle (G12 und H12) als Referenzprobe aufgetragen. Wenn das amplifizierte Produkt zum ersten Mal in der Datenreihe sichtbar wird (deutlich fluoresziert), wird dies im „crossing point“ (Cp) angegeben. Für die Visualisierung der PCR-Produkte muss die Anzahl der Produktmoleküle die Nachweisgrenze der Reaktion deutlich überschritten werden. Die Anzahl der DNA Kopien lassen sich mit dem Cp-Wert berechnen und sind für jeden Organismus in der Tabelle 19 dargestellt. Der Cp-Wert dient zur Abschätzung der Einstufung der Probe. Eine Probe wird als sicher positiv angenommen, wenn der Cp unter einen Wert von 33 fällt. In der Abbildung 18 B kann der Cp-Wert zusammen mit dem Name der Probe abgelesen werden. Die Amplifikationskurve ist in der Abbildung 18 C dargestellt. Kommt es zu einer Amplifizierung der Erregersequenz mit dem dazugehörigen Primer,

kann das PCR-Produkt über eine Lichtquelle angeregt werden und die Fluoreszenz der Farbstoffe kann in einem Diagramm abgebildet werden. Die Menge des PCR-Produktes korreliert mit der Fluoreszenz. Die Amplifikationskurve ergibt sich aus folgender Formel:

$$T_n = T_0 \times E^n$$

T_n = Anzahl der Zielmoleküle zum Zyklus n

T_0 = ist die anfängliche Zahl an Zielmolekülen

E = Effizienz der Amplifikation

n = Anzahl an Amplifikationszyklen

Unter der Annahme, dass eine perfekte Amplifikationsreaktion stattfindet, wird die Effizienz in der Routine auf zwei festgesetzt. Dies bedeutet, dass jedes PCR-Produkt in jedem Zyklus genau einmal repliziert wird. So ergibt sich folgende Formel für die Berechnung der Amplifikationskurve:

$$T_n = T_0 \times 2^n$$

Außerdem können verschiedene Einstellungen an der Analysensoftware vorgenommen werden (Abbildung 18 D). So lassen sich zum Beispiel die Color Compensation mit dem Feld „Color Comp“ zuschalten und mit dem Button „Filter Comp“ der Ablesekanal auswählen.

Tabelle 19: Berechnungsformeln für die DNA Kopien der einzelnen Organismen

Diese Tabelle listet die einzelnen Berechnungsformeln für die DNA Kopien der einzelnen Organismen auf. Wobei x die „Anzahl der DNA Kopien/ml“ und y den „Cp-Wert der Probe“ darstellt.

Organismus	Quantifizierungsformel	zur
Berechnung der DNA Kopien		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	$x = e^{(y-42,566/(-1,423))}$	
<i>Mycoplasma genitalium</i>	$x = e^{(y-43,165/(-1,414))}$	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	$x = e^{(y-46,433/(-1,498))}$	
<i>Trichomonas vaginalis</i>	$x = e^{(y-42,052/(-1,35))}$	
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	$x = e^{(y-41,644/(-1,341))}$	
<i>Ureaplasma parvum</i>	$x = e^{(y-40,527/(-1,306))}$	
<i>Mycoplasma hominis</i>	$x = e^{(y-39,669/(-1,266))}$	

Die Multiplex Real-Time PCR Urethritis plus wurde mit 251 Proben durchgeführt. Deren Ergebnisse sind in der Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Ergebnisübersicht der Multiplex Real-Time PCR Urethritis plus

Diese Tabelle listet die mit der PCR identifizierten Mikroorganismen zusammen mit ihrer Häufigkeit auf.

Erreger	Vorkommen in Proben
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2
<i>Mycoplasma genitalium</i>	2
<i>Chlamydia trachomatis</i>	10
<i>Trichomonas vaginalis</i>	8
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	9
<i>Ureaplasma parvum</i>	71
<i>Mycoplasma hominis</i>	20

Von den 251 getesteten Proben konnte in 150 Fällen keiner der Erreger nachgewiesen werden. Die zwei kulturell identifizierten *Neisseria gonorrhoeae* Erreger, lieferte auch die PCR. Der Erreger *Mycoplasma genitalium* wurde zweimal detektiert und *Mycoplasma hominis* 20-mal. *Chlamydia trachomatis* wurde in 10 Vaginalabstrichen identifiziert. *Trichomonas vaginalis* wurde mittels PCR in 8 Proben erkannt. Der Keim *Ureaplasma urealyticum* wurde nur 9-mal nachgewiesen. Wohingegen *Ureaplasma parvum* in 71 Vaginalabstrichen detektiert werden konnte.

5.5 Darstellung der Ergebnisse der weiteren molekularbiologischen Tests

5.5.1 Nukleinsäure-Hybridisierung Affirm-Test

Der Affirm-Test diente zum Nachweis von *Trichomonas vaginalis*, *Candida*-Spezies und *Gardnerella vaginalis*. Es wurden insgesamt 20 Proben getestet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 21 einzusehen.

Tabelle 21: Ergebnisübersicht des Affirm-Tests

Diese Tabelle listet die mit dem Affirm-Test identifizierten Mikroorganismen zusammen mit ihrer Häufigkeit auf.

Erreger	Auswertung	Anzahl der Proben
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Positiv	0
	Negativ	20
<i>Candida</i> -Spezies	Positiv	0
	Negativ	20
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Positiv	0
	Negativ	20

Von den 20 getesteten Proben lieferte keinen Erregernachweis. Das Testfeld (Abbildung 19) zeigte aber an, dass der Test als solches funktioniert hat. Nach der Überprüfung der 20 Proben mittels kulturellem Verfahren und Multiplex Real-Time PCR ergab sich, dass in jeder Probe mindestens ein Erreger (*Trichomonas vaginalis*, *Candida*-Spezies und *Gardnerella vaginalis*) nachweisbar war.



Abbildung 19: Sonden-Analysekarte von 6 getesteten Vaginalabstrichen

Dargestellt sind 6 Sonden-Analysenkarten von getesteten Vaginalabstrichen. Eine Blaufärbung bei dem Feld „+“ zeigt an, dass der Test erfolgreich funktioniert hat. Die fehlende Blaufärbung bei den einzelnen Organismen bedeutet, dass dieser in der Probe nicht nachweisbar war.

5.5.2 TMA Panther®

Mit dem molekularbiologischen Vollautomat Panther® wurden 20 Proben mit dem „Aptima Combo 2 for CT/NG assay“ auf *Chlamydia trachomatis* und *Neisseria gonorrhoeae* getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 einzusehen.

Tabelle 22: Ergebnisübersicht des Vollautomat Panther®

Diese Tabelle listet die mit dem Vollautomat Panther® identifizierten Mikroorganismen zusammen mit ihrer Häufigkeit auf.

Erreger	Auswertung	Anzahl der Proben
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Positiv	10
	Negativ	10
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Positiv	1
	Negativ	19

Von den 20 Proben mit dem Verdacht auf „Chlamydien“ (angegeben vom Einsender) konnten der Erreger *Chlamydia trachomatis* in 10 Fällen bestätigt werden. Eine Probe lieferte zusätzlich *Neisseria gonorrhoeae* als positives Ergebnis.

6 Diskussion

6.1 Vergleich der Mikroskopie mit der Kultur

Von den 250 mikroskopierten Proben konnten in 160 Fällen eine Aussage über die bakterielle Vaginose anhand des Nugent-Scores (Tabelle 17) getroffen werden. In den restlichen 90 Fällen lag die Bewertung bei „intermediär“, so dass hier keine genaue Beurteilung möglich und die Anzüchtung auf einem Nährmedium (GAR-Agar) notwendig ist [Mending *et al.*, 2006]. Die Tabelle 23 zeigt einen Vergleich zwischen dem mikroskopisch ermitteltem Nugent-Score der 160 Proben und dem Nachweis des Erregers auf dem GAR-Agar.

Tabelle 23: Vergleich von Nugent-Score und kulturell nachgewiesener bakteriellen Vaginose (BV)
Diese Tabelle zeigt einen Vergleich zwischen dem ermittelten Nugent-Score und der kulturell nachgewiesenen bakteriellen Vaginose.

	Kultur		
	Positiv	Negativ	
Nugent-Score	Positiv	18 (11,25 %)	5 (3,125 %) 23
	Negativ	12 (7,5 %)	125 (78,125 %) 137
		30	130 160

In 18 Fällen konnte die positiv beurteilte Mikroskopie von der Kultur bestätigt werden. Auch in 125 Fällen war dies bei einem negativen Befund der Fall. Eine Diskrepanz bestand in 17 Fällen. Dabei lieferte in 12 Fällen der Nugent-Score ein negatives Ergebnis, obwohl die Kultur ein positives Ergebnis ermittelte. Bei 5 Proben war dies genau andersherum.

Aus der Tabelle 23 lassen sich die Sensitivität und Spezifität mit folgenden Formeln berechnen:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtig positiver}}{(\text{Anzahl richtig positiver} + \text{Anzahl falsch negativer})}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtig negativer}}{(\text{Anzahl richtig negativer} + \text{Anzahl falsch positiver})}$$

Unter der Voraussetzung, dass der Nugent-Score der Goldstandard für die Diagnose einer bakteriellen Vaginose ist, ergibt sich eine Sensitivität von 78,26 % und eine Spezifität von 91,24 % für den kulturellen Nachweis. Sha *et al.* detektierte eine etwas höhere Sensitivität (78,4 %) und Spezifität (95,6%) für die Multiplex PCR zur Detektion einer bakteriellen Vaginose [Sha et al., 2005].

Die Leitlinie der AWMF definiert die bakterielle Vaginose als mikrobielle Dysbalance der Vaginalflora [Leitlinie S1 AWMF; 2013]. Diese Dysbalance zeichnet sich durch eine Konzentrationsabnahme der Laktobazillen und eine deutliche Zunahme von anaeroben Bakterien aus. Zur Diagnose sind in dieser Leitlinie folgende Kriterien festgehalten: dünnflüssiger, homogener Fluor, pH-Wert in der Scheide über 4,5, Amingeruch des Fluor und der Nachweis von mehr als 20 % von Schlüsselzellen (clue cells) im Nativpräparat [Leitlinie S1 AWMF; 2013]. „Clue cells“ sind Epithelzellen, welche dicht mit Mikroorganismen überzogen sind [Harmanli *et al.*, 2000]. Als Alternative kann auch der Nugent-Score eine Beurteilung für die bakterielle Vaginose sein [Leitlinie S1 AWMF; 2013]. Ein Nachteil ist, dass sich keine Aussage zu dem „intermediären“ Zustand treffen lässt. Dies kann ein Übergang zur Normalflora oder zu einer bakteriellen Vaginose sein. Auch kann dies bedeuten, dass andere Infektionen vorliegen. Besonders in solchen Fällen ist die kulturelle Anzucht zur Beurteilung von Vaginitis Erregern notwendig.

Die Unterschiede zwischen der Mikroskopie und dem kulturellen Verfahren (Tabelle 23) können verschiedene Ursachen haben. Für die Berechnung des Nugent-Scores werden gramnegative Stäbchen angegeben. Bei diesen könnte es sich zum Beispiel um *Escherichia coli* handeln. *Escherichia coli* ist allerdings nicht ein Auslöser für eine bakterielle Vaginose, sondern kann durch Verschleppung der Stuhlflora in die Vagina gelangen. Auch kann eine gestörte Vaginalflora in der Mikroskopie wie eine bakterielle Vaginose erscheinen. Das Fehlen von Laktobazillen kann aber auch andere Gründe haben. So können zum Beispiel Fremdkörper (Tampon), fehlende Hormone oder eine Antibiotika-Therapie (zur Behandlung einer anderen Krankheit) die Abwesenheit der Laktobazillen erklären. Dadurch erhöht sich natürlich das Risiko für eine Infektion. Auch gehen andere Krankheiten wie zum Beispiel Gonorrhoe oder Chlamydien-Infektionen mit fehlenden Laktobazillen einher [Donders *et al.*, 1993]. Kleine Mengen

möglicher pathogener Keime können zur Standortflora gehören ohne Beschwerden hervorzurufen [Donders, 2004]. Diese können über den Nugent-Score detektiert werden und ggf. zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Eine Detektion von *Gardnerella vaginalis* ist nicht obligatorisch mit einer bakteriellen Vaginose verbunden. Es gibt Frauen die speziell für *Gardnerella vaginalis* einen Antikörper (Immunoglobulin A) produzieren oder aber in der Lage sind Spaltungsenzyme als Schutz gegen *Garnderella vaginalis* einsetzen [Donders, 2004]. In diesem Zusammenhang muss immer der behandelnde Arzt die Entscheidung treffen, ob eine Therapie von Nöten ist oder nicht.

6.2 Vergleich der kulturell ermittelten Erreger und der PCR

Das Kit MYCOPLASMA DUO von Bio-Rad zur Identifizierung und Differenzierung genitaler Mykoplasmen wurde für die Detektion von *Mycoplasma hominis* und *Ureaplasma urealyticum* genutzt. Bei 250 der 251 Proben konnte ein Vergleich der kulturell nachgewiesenen Erreger mit den detektierten Keimen der Multiplex Real-Time PCR verglichen werden. Die eine nicht vergleichbare Probe belief sich nur auf ein Gonorrhö-Screening. Bei dem verminderten Plattensatz kann keine Aussage über weitere pathogene Keime getroffen werden. Eine Übersicht der Erreger *Mycoplasma hominis* und *Ureaplasma urealyticum* sind in den Tabellen 24 und 25 zu sehen.

Tabelle 24: Vergleich der kulturell detektierten *Mycoplasma hominis* mit den Ergebnissen der Multiplex Real-Time PCR

Diese Tabelle zeigt einen Vergleich zwischen den kulturell nachgewiesenen Erreger *Mycoplasma hominis* und der Detektion mittels Multiplex Real-Time PCR.

		<i>Mycoplasma hominis</i>		
		Kultur		
<i>Mycoplasma hominis</i> PCR		Positiv	Negativ	
	Positiv	6 (2,4 %)	14 (5,6 %)	20
	Negativ	2 (0,8 %)	228 (91,2 %)	230
		8	242	250

Tabelle 25: Vergleich der kulturell detektierten *Ureaplasma urealyticum* mit den Ergebnissen der Multiplex Real-Time PCR

Diese Tabelle zeigt einen Vergleich zwischen den kulturell nachgewiesenen Erreger *Ureaplasma urealyticum* und der Detektion mittels Multiplex Real-Time PCR.

		<i>Ureaplasma urealyticum</i>		
		Kultur		
<i>Ureaplasma urealyticum</i> PCR		Positiv	Negativ	
	Positiv	11 (4,4 %)	3 (1,2 %)	14
	Negativ	49 (19,6 %)	187 (74,8 %)	236
		60	190	250

In 6 Fällen (2,4%) konnte der Erreger *Mycoplasma hominis* sowohl in dem kulturellen als auch mit dem molekularbiologischen Verfahren nachgewiesen werden. Bei 228 Fällen (91,2 %) lieferten beide Methoden ein negatives Ergebnis. Ein positives PCR Ergebnis, obwohl die Kultur ein negatives Resultat voraussagte war bei 14 Proben (5,6 %) der Fall. Das umgekehrte Resultat konnte in zwei Vaginalabstrichen (0,8 %) bestimmt werden. Da die PCR sensitivere Ergebnisse liefert [Cunningham *et al.*, 2013], ist anzunehmen, dass die 14 molekularbiologisch positiv detektierten Proben auch richtig positiv Ergebnisse sind. Von den zwei PCR negativ/Kultur positiv ermittelten Proben, lieferte eine nur ein schwach positives Ergebnis. Dieses Ergebnis könnte aufgrund Inhibition oder Verunreinigung ein falsch negatives Ergebnis geliefert haben. Die andere Probe lieferte als PCR Ergebnis nur *Ureaplasma parvum*. Auf den Kulturmedien konnten *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* und weitere Standortflora identifiziert werden. Als mögliche Ursache für ein falsch positives Ergebnis könnte eine Verunreinigung durch einen anderen Mikroorganismen zugrunde

liegen oder die PCR lieferte kein ausschlaggebendes Resultat. Als Grundlage für die kulturelle Identifizierung von *Mycoplasma hominis* dient die biochemische Hydrolyse von Arginin [Morada *et al.*, 2010].

Als weiterer pathogener Vaginitis Erreger zählt *Mycoplasma genitalium*. Derzeit ist eine Identifizierung mit kulturellen Methoden zu unsicher, da eine Kultivierung mehrere Wochen Zeit beansprucht [Darai *et al.*, 2012]. Daher wird die molekularbiologische Methode der PCR als geeigneter erachtet [Darai *et al.*, 2012]. Von den 251 getesteten Vaginalabstrichen konnte der Erreger *Mycoplasma genitalium* in 2 Fällen nachgewiesen werden.

Eine Übereinstimmung der Ergebnisse (positiv und negativ) in Bezug auf den Erreger *Ureaplasma urealyticum* war in 198 Proben der Fall. Bei 52 Vaginalabstrichen besteht eine Diskrepanz zwischen den kulturellen und molekularbiologischen Methoden. Die Multiplex Real-Time PCR lieferte in 3 Fällen ein positives Ergebnis, welches nicht von der Kultur bestätigt werden konnte. Da die PCR sensitivere Ergebnisse liefert, kann dies als richtig positiv angenommen werden [Cunningham *et al.*, 2013; Willoughby *et al.*, 1991]. Die größte Schwankung (49 Proben) besteht bei einem kulturell positiven und einem negativen PCR Resultat.

Da das molekularbiologische Verfahren, PCR, in der Literatur als sensitivere Methode zum Nachweis von Myko- und Ureaplasmen angegeben wird, dient diese hier als Referenz zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität des kulturellen Verfahrens beider Erreger [Eun *et al.*, 2013; Waites *et al.*, 2005]. Für *Mycoplasma hominis* ergeben sich eine Sensitivität von 30 % und eine Spezifität von 99,13 %. Mit einer Sensitivität von 78,57 % und einer Spezifität von 79,24 % liegen diese Werte höher für *Ureaplasma urealyticum*. Der molekularbiologische Nachweis von *Mycoplasma hominis* mittels PCR lieferte eine Sensitivität von 90,7 % und eine Spezifität von 99,2 % [Cunningham *et al.*, 2013]. Für den Erreger *Ureaplasma urealyticum* konnte in derselben Studie eine Sensitivität von 96,5 % und eine Spezifität von 93,8 % der PCR ermittelt werden [Cunningham *et al.*, 2013]. In dieser Studie wurde die PCR gegen ein kulturelles Verfahren getestet [Cunningham *et al.*, 2013].

Bei der Betrachtung der 49 Proben konnte festgestellt werden, dass in vielen Fällen anstatt *Ureaplasma urealyticum* der Erreger *Ureaplasma parvum* detektiert wurde. Das Kit Mycoplasma Duo von Bio-Rad identifiziert *Ureaplasma urealyticum* aufgrund seiner Stoffwechseleigenschaften. Bei der Hydrolyse von Harnstoff wird Ammoniak freigesetzt, welcher zu einer pH-Änderung führt. Diese pH-Änderung wird bei einem positiven Resultat durch einen Farbindikator (Phenolrot) angezeigt. Ureaplasmen werden in zwei Biovarianten und 14 Serotypen unterschieden. Diese Unterschiede belaufen sich unter anderem auf die Genomgröße, 16S rRNA Gen Sequenz, Enzym Polymorphismen und DNA-DNA Hybridisierung [Sung, 2013]. Für die Hydrolyse des Harnstoffes verwendet *Ureaplasma urealyticum* das Enzym Urease. Nach einer BLAST-Suche der Urease (Accession-Nummer: WP_004025994) von *Ureaplasma urealyticum* stellte sich heraus, dass diese Urease zu 95% identisch ist mit der Urease (Accession-Nummer: WP_006689327) von *Ureaplasma parvum*. Das BLAST-Ergebnis ist in der Abbildung 20 dargestellt.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	urease accessory protein [Ureaplasma urealyticum]	599	599	100%	0.0	100%	WP_004025994.1
<input type="checkbox"/>	urease accessory protein [Ureaplasma parvum]	577	577	100%	0.0	95%	WP_006689327.1
<input type="checkbox"/>	urease accessory protein [Ureaplasma parvum]	576	576	100%	0.0	95%	WP_006688613.1
<input type="checkbox"/>	urease accessory protein [Ureaplasma diversum]	431	431	99%	1e-150	68%	WP_038103380.1
<input type="checkbox"/>	urease accessory protein UreD [Ureaplasma diversum]	430	430	99%	3e-150	68%	AJQ45234.1

Abbildung 20: BLAST-Ergebnis für die urease accessory protein [*Ureaplasma urealyticum* WP_004025994.1]

Diese Abbildung zeigt das Ergebnis einer BLAST-Suche mit der Urease von *Ureaplasma urealyticum* (Accession-Nummer: WP_004025994). Als erstes Ergebnis liefert das Programm die eingegebene Urease. Die beiden darauf folgenden Resultate sind die Ureasen zwei verschiedener Serotypen von *Ureaplasma parvum*. Anhand der abgebildeten Werte kann nun festgestellt werden, dass die Ureasen beider Mikroorganismen zu 95 % identisch sind.

Es ist davon auszugehen, dass das Kit Mycoplasma Duo von Bio-Rad mittels Hydrolyse von Harnstoff keine Unterscheidung zwischen den Erregern *Ureaplasma urealyticum* und *Ureaplasma parvum* liefern kann. Beide Organismen besitzen eine Urease, welche sequenziell zu 95 % identisch ist. Unter der Annahme, dass keine kulturelle Unterscheidung zwischen der Erregern getroffen werden kann, wurden für die

Ergebnisse beide Organismen als „Ureaplasmen“ zusammengefasst, neu ausgewertet und in der Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Erweiterter Vergleich der kulturell nachgewiesenen Ureaplasmen mit den Ergebnissen der Multiplex Real-Time PCR

Diese Tabelle zeigt den erweiterten Vergleich zwischen den kulturell nachgewiesenen Ureaplasmen und der Detektion mittels Multiplex Real-Time PCR.

		Ureaplasmen Kultur		
		Positiv	Negativ	
Ureaplasmen PCR	Positiv	54 (21,6 %)	27 (10,8 %)	81
	Negativ	6 (2,4 %)	163 (65,2 %)	169
		60	190	250

Bei 217 Vaginalabstrichen konnte eine Übereinstimmung der Ergebnisse (positiv bzw. negativ) festgestellt werden. Die vorher ermittelte Diskrepanz zwischen den restlichen Proben ist nun nicht mehr so exorbitant. So konnten die PCR negativ/Kultur positiven Ergebnisse von 19,6 % auf 2,4 % abgesenkt werden. Diese 6 Fälle von PCR negativ/Kultur positiven Resultaten kann an einer Verunreinigung des Kits oder einem Ausfall der PCR liegen. Auch kam es zu einer Änderung der Sensitivität und Spezifität der *Ureaplasma*-Spezies. Die Sensitivität sinkt von 78,57 % auf 66,6 %. Allerdings steigt die Spezifität von 79,24 % auf 96,45 %. Die PCR ist in der Lage schon kleinste DNA Mengen zu amplifizieren und detektieren. Da es sich bei dem kulturellen Kit um eine reine optische Beurteilung handelt, können schwach sichtbare Farbumschläge als falsch negativ erkannt werden. Dies erklärt die Senkung der Sensitivität. Für die neue Berechnung wurden die beiden Erreger *Ureaplasma urealyticum* und *Ureaplasma parvum* zusammengefasst. Dadurch sind nun ein großer Teil der vorher kulturell falsch positiven Ergebnisse richtig positiv. Dies führte zu einem Anstieg der Spezifität.

Tabelle 27: Vergleich der kulturell detektierten *Neisseria gonorrhoeae* mit den Ergebnissen der Multiplex Real-Time PCR

Diese Tabelle zeigt einen Vergleich zwischen den kulturell nachgewiesenen Erreger *Neisseria gonorrhoeae* und der Detektion mittels Multiplex Real-Time PCR.

Neisseria gonorrhoeae Kultur

<i>Neisseria gonorrhoeae</i> PCR	Positiv		Negativ	
	Positiv	2 (0,8 %)	Negativ	0 (0 %)
	Negativ	0 (0 %)	249 (99,2 %)	249
		2	249	251

Anhand der Tabelle 27 lässt sich erkennen, dass die zwei mit *Neisseria gonorrhoeae* infizierten Vaginalabstriche, sowohl mit der PCR als auch mit dem kulturellen Verfahren eindeutig nachweisbar sind. Dadurch nehmen auch die Sensitivität und Spezifität einen Wert von 100 % an. Der Stichprobenumfang ist eindeutig zu gering für eine qualitative Aussage und sollte erhöht werden. In der Literatur werden eine Sensitivität von 95,2 % und eine Spezifität von 99,4 % für die PCR angegeben [Van Dyck *et al.*, 2001]. Für den kulturellen Nachweis ergeben sich eine Sensitivität von 69,8 % und eine Spezifität von 100 % [Van Dyck *et al.*, 2001].

6.3 Auswertung der molekularen Verfahren

6.3.1 Multiplex Real-Time PCR

Das LightCycler System ist in der Lage auf verschiedenen Ablesekanälen zwei oder mehr Sequenzen einer Probe in einer Kapillare zu detektieren. Ein solches Assay erfordert spezifische Mengen an Hybridisierungsproben. Jede Probe wird mit einem anderen FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Akzeptor Farbstoff gelabelt, um diesen über die verschiedenen Wellenlängen erkennen zu können. Für das verwendete Kit wurden folgende vier Farbstoffe genutzt: FAM, YD, ROX und Cy5. Allerdings kann es zu einer Überlappung der Emissionsspektren kommen. Dabei bekommt der Ablesekanal ein Signal aus einem anderen Kanal. Dies wird „crosstalk“ genannt. Die Überlappung der Fluoreszenzsignale kann nicht interpretiert werden. Um dieses Problem zu umgehen, kann die Color Compensation verwendet werden. Die Color Compensation kann während des Experimentes oder vor der Datenanalyse zugeschaltet werden. Bei der Color Compensation handelt es sich um eine positiv

Kontrolle mit spezifischen Werten für die einzelnen Spektren der Farbstoffe. Dies dient als Referenz. Während der Analyse des Experimentes wird die Color Compensation als Referenz verwendet und mit den Analysewerten verglichen. So wird verhindert, dass ein falsch positives Ergebnis geliefert wird.

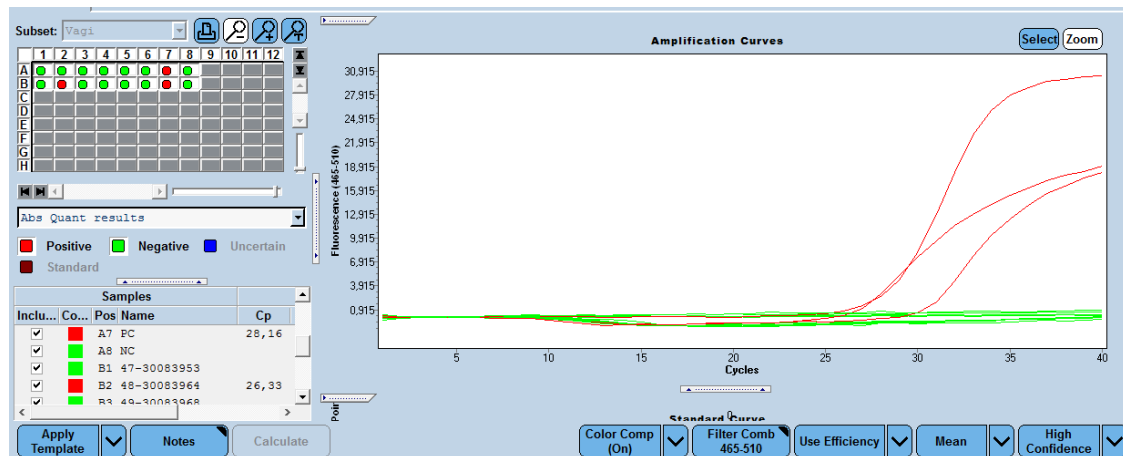


Abbildung 21: Ergebnis einer PCR Analyse (Filterkombination: 465 - 510 nm)

Diese Abbildung zeigt eine Analysenübersicht von sechs Patientenproben und einer positiven bzw. negativen Kontrolle. Als Filterkombination wurde der 1. Ablesekanal bei einer Wellenlänge von 465 - 510 nm verwendet. Es ist zu erkennen, dass außer den positiven Kontrollen eine Probe den Erreger *Trichomonas vaginalis* enthält.

Die Abbildung 21 zeigt das PCR Ergebnis für sechs Patientenproben (Belegung: A1-A6 und B1-B6) bei einer Filterkombination von 465 - 510 nm. Zusätzlich wird bei jedem Experiment eine positiv (A7 und B7) bzw. negativ (A8 und B8) Kontrolle als Referenz mitgeführt. Die Kontrollen sind für Auswertung besonders wichtig, denn anhand dieser kann das System bestimmen, ob eine Probe wirklich positiv ist. Bei einem Ausfall der Kontrollen muss das ganze Experiment wiederholt werden. Bei der Belegung bildet die A-Reihe den PPMix 1 und die B-Reihe den PPMix 2. In der Kapillare B2 wird ein positives Signal zurückgegeben. Anhand der Tabelle 2 (Darstellung der PPMixe mit den dazugehörigen Erregern und ihrer Detektionswellenlänge) wird ersichtlich, dass sich in dieser Probe der Erreger *Trichomonas vaginalis* befindet.

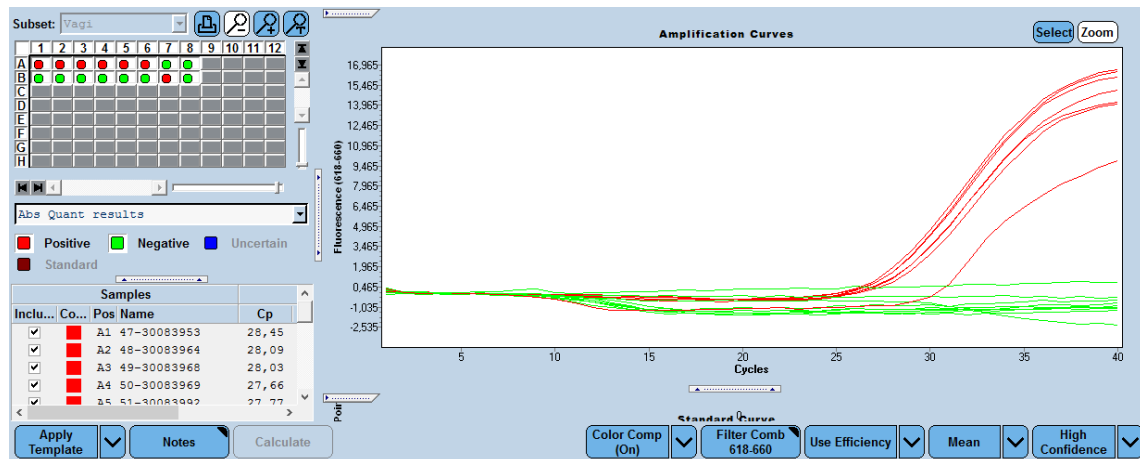


Abbildung 22: Ergebnis einer PCR Analyse (Filterkombination: 618 - 660 nm)

Diese Abbildung zeigt eine Analysenübersicht von sechs Patientenproben und einer positiven bzw. negativen Kontrolle. Als Filterkombination wurde der 4. Ablesekanal bei einer Wellenlänge von 618 - 660 nm verwendet. In der Belegung der Reihe A wird die interne Kontrolle in den Patientenproben nachgewiesen. Die Reihe B weist den Erreger *Mycoplasma hominis* nach.

Für dieselben Proben (Abbildung 21) ist in der Abbildung 22 die Filterkombination 618 - 660 nm (4. Ablesekanal) dargestellt. Bei der Belegung in der A-Reihe wird die interne Kontrolle nachgewiesen. Die interne Kontrolle wird vor der DNA Extraktion zu der Patientenprobe gegeben. Die Amplifikationskurven aller Proben müssen einen ähnlichen Verlauf mit ähnlichem Cp-Wert aufweisen. Dieser Cp-Wert muss unter den Wert von 33 fallen. In der positiv (A7) bzw. negativ (A8) Kontrolle befindet sich keine interne Kontrolle, deshalb liefern diese Proben ein negatives Ergebnis. Sollte die interne Kontrolle einer Patientenprobe von den anderen Kontrollen abweichen oder als negativ ausgegeben werden, muss diese Probe nochmals extrahiert und mittels LightCycler 480 analysiert werden. Die B-Reihe der Belegung weist den Erreger *Mycoplasma hominis* nach. Die sechs Proben waren negativ. Nur die Positivkontrolle liefert ein deutlich positives Fluoreszenzsignal.

Die Multiplex Real-Time PCR liefert für die Diagnostik die besten Ergebnisse. Sie eignet sich am besten für den Nachweis spezieller pathogener Mikroorganismen. Außerdem ist die Multiplex Real-Time PCR in der Lage die verschiedenen Ureaplasmen und Mykoplasmen Spezies voneinander zu unterscheiden. Für eine Resistenzstatistik und die Beurteilung der vaginalen Flora muss allerdings das kulturelle Verfahren hinzugezogen werden.

6.3.2 Nukleinsäure-Hybridisierung Affirm-Test

Die Tabelle 28 zeigt den Vergleich der molekularbiologisch detektierten *Trichomonas vaginalis*. Als molekularbiologische Verfahren dienten der Affirm-Test von BD und die Multiplex Real-Time PCR von fast-track. Aus Kostengründen wurden nur 20 Patientenproben untersucht. Für qualitativ bessere statistische Aussagen muss der Stichprobenumfang erhöht werden.

Tabelle 28: Vergleich der mit der PCR detektierten *Trichomonas vaginalis* mit den Ergebnissen des Affirm-Test

Diese Tabelle zeigt einen Vergleich zwischen den mit dem Affirm-Test nachgewiesenen Erreger *Trichomonas vaginalis* und der Detektion mittels Multiplex Real-Time PCR.

Trichomonas vaginalis Affirm-Test

		Positiv	Negativ	
<i>Trichomonas vaginalis</i> PCR	Positiv	0 (0 %)	7 (35 %)	7
	Negativ	0 (0 %)	13 (65 %)	13
		0	20	20

Von den insgesamt 20 getesteten Proben (Tabelle 28) konnte der Erreger *Trichomonas vaginalis* in sieben Patientenproben mittels PCR detektiert werden. Der Affirm-Test lieferte keine positive Probe, obwohl die Testfeld-Perle eine blaue Farbe aufgewiesen hat. Die Blaufärbung des Testfeldes dient als Überprüfung für den gesamten Test und sagt in diesem Fall aus, dass der Affirm-Test funktioniert hat. Eine Übereinstimmung in Bezug auf die negativen Proben (kein Erregernachweis) lieferten 13 Patientenproben. Dies entspricht 65 % der gesamten überprüften Versuche.

Tabelle 29: Vergleich der kulturell detektierten *Candida*-Spezies mit den Ergebnissen des Affirm-Test

Diese Tabelle zeigt einen Vergleich zwischen den mit dem Affirm-Test nachgewiesenen *Candida*-Spezies und deren Detektion mittels Multiplex Real-Time PCR.

Candida-Spezies Affirm-Test

		Positiv	Negativ	
<i>Candida</i> -Spezies Kultur	Positiv	0 (0 %)	2 (10 %)	2
	Negativ	0 (0 %)	18 (90 %)	18
		0	20	20

Die Tabelle 29 vergleicht die kulturell detektierten *Candida*-Spezies mit dem Affirm-Test. Insgesamt konnten in zwei von 20 Proben *Candida albicans* kulturell nachgewiesen werden. Diesen Nachweis konnte der Affirm-Test nicht leisten. Die negativen Proben lieferten eine Übereinstimmung von 90 %.

Tabelle 30: Vergleich der kulturell detektierten *Gardnerella vaginalis* mit den Ergebnissen des Affirm-Test

Diese Tabelle zeigt einen Vergleich zwischen den mit dem Affirm-Test nachgewiesenen Erreger *Gardnerella vaginalis* und deren Detektion mittels Multiplex Real-Time PCR.

Gardnerella vaginalis Affirm-Test

		Positiv	Negativ	
<i>Gardnerella vaginalis</i> Kultur	Positiv	0 (0 %)	5 (25 %)	5
	Negativ	0 (0 %)	15 (75 %)	15
		0	20	20

Ein Vergleich der kulturell nachgewiesenen *Gardnerella vaginalis* mit dem Affirm-Test ist in der Tabelle 30 dargestellt. Eine Übereinstimmung beider Verfahren lieferten die negativen Proben. Die Deckung dieser Ergebnisse lag bei 75 %. Eine Diskrepanz bestand bei dem positiven kulturellen Erregernachweis von *Gardnerella vaginalis* zu den negativen Resultaten des Affirm-Tests. Dieser Unterschied kam bei 5 Proben (25 %) vor.

Für den sicheren Nachweis von *Trichomonas vaginalis*, *Candida*-Spezies und *Gardnerella vaginalis* ist der Affirm-Test ungeeignet. In keinem der 20 Proben konnte dieser Test einen Erregernachweis liefern. Die Berechnung der Sensitivität und Spezifität für den Affirm-Test ist für diesen Test nicht aussagekräftig. Die Sensitivität für alle drei getesteten Erreger ergab 0 % und die Spezifität 100 %. Für den Nachweis dieser Erreger können sowohl kulturelle als auch molekularbiologische Verfahren bessere Ergebnisse erzielen und sollten deshalb immer bevorzugt Anwendung finden. Das Paper von Cartwright *et al.* empfiehlt andere Nachweismethoden zur Detektion dieser drei Erreger [Cartwright *et al.*, 2013]. In diesem Paper wurden für den Nachweis der Erreger unterschiedliche NAAT (Nucleic Acid Amplification Tests) Verfahren zum Vergleich mit dem Affirm-Test genutzt. Eine Multiplex-PCR für die Detektion der bakteriellen Vaginose lieferte eine 6,8 %ige höhere Sensitivität (PCR: 96,9 %; Affirm: 90,1 %) und eine 25 %ige höhere Spezifität (PCR: 92,6 %; Affirm: 67,6 %) [Cartwright

et al., 2013]. Die CAN-PCR zum Nachweis von *Candida albicans* und *Candida glabrata* erzielte eine 39,6 %ige höhere Sensitivität (PCR: 97,7 %; Affirm: 58,1 %) [Cartwright *et al.*, 2013]. Jedoch lag die Spezifität in diesem Fall mit 6,8 % etwas niedriger wie bei dem Affirm-Test (PCR: 93,2 %; Affirm: 100 %) [Cartwright *et al.*, 2013]. Für den Nachweis von *Trichomonas vaginalis* wurde ein Assay von GenProbe Aptima genutzt. Die Sensitivität des Assays lag mit 51,8 % viel höher wie die Sensitivität des Affirm-Tests (Assay: 98,1 %, Affirm: 46,3 %) [Cartwright *et al.*, 2013]. Dieses Paper zeigt, dass die Genauigkeit der NAAT-Verfahren im Vergleich zum Affirm-Test eindeutig höher liegt und unterstützt somit die in der Arbeit gelieferten Ergebnisse. Für die Erreger *Candida*-Spezies und *Gardnerella vaginalis* wird ein kultureller Nachweis empfohlen [Neumeister *et al.*, 2009]. Für *Gardnerella vaginalis* eignet sich neben dem kulturellen Nachweis auch die Beurteilung nach Nugent-Score. Bei dem Erreger *Trichomonas vaginalis* ist der molekularbiologische Nachweis basierend auf NAAT-Verfahren die sicherste Methode zur eindeutigen Identifizierung [Neumeister *et al.*, 2009].

6.3.3 TMA Panther®

Die Tabellen 31 und 32 zeigen eine Gegenüberstellung für die beiden getesteten molekularbiologischen Verfahren. Es wurden die beiden Erreger *Chlamydia trachomatis* und *Neisseria gonorrhoeae* mittels Multiplex Real-Time PCR und TMA Panther untersucht. Aus Kostengründen wurde die Probenzahl auf 20 fest gesetzt. Für statistisch signifikantere Ergebnisse muss der Stichprobenumfang erhöht werden.

Tabelle 31: Vergleich der mit der PCR detektierten *Chlamydia trachomatis* mit den Ergebnissen des TMA Panther

Diese Tabelle zeigt einen Vergleich zwischen den mit dem Affirm-Test nachgewiesenen Erreger *Chlamydie trachomatis* und deren Detektion mittels Multiplex Real-Time PCR.

Chlamydia trachomatis Panther

		<i>Chlamydia trachomatis</i> Panther		
		Positiv	Negativ	
<i>Chlamydia trachomatis</i> PCR	Positiv	10 (50 %)	0 (0 %)	10
	Negativ	0 (0 %)	10 (50 %)	10
		10	10	20

Aus der Tabelle 31 ist ersichtlich, dass die Ergebnisse (Nachweis von *Chlamydia trachomatis*) beider Verfahren übereinstimmen. Die Hälfte der 20 Proben war positiv. Auch die Ergebnisse für die Detektion von *Neisseria gonorrhoeae* stimmen in beiden Verfahren überein. So konnten die 2 positiven Gonorrhö Proben von der Multiplex Real-Time PCR und dem TMA Panther eindeutig identifiziert werden.

Tabelle 32: Vergleich der kulturell detektierten *Neisseria gonorrhoeae* mit den Ergebnissen des TMA Panther

Diese Tabelle zeigt einen Vergleich zwischen den mit dem Affirm-Test nachgewiesenen Erreger *Neisseria gonorrhoeae* und deren Detektion mittels Multiplex Real-Time PCR.

Neisseria gonorrhoeae Panther

<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Kultur	Positiv		Negativ	
	Positiv	2 (10 %)	Negativ	0 (0 %)
	Negativ	0 (0 %)	18 (90 %)	18
		2	18	20

Diese sehr guten Ergebnisse werden von der Literatur unterstützt. So wird das „Aptima Combo 2 for CT/NG assay“ mit der besten Sensitivität im Vergleich zu kommerziellen Nukleinsäuren Amplifikationstests für die Diagnostik von *Chlamydia trachomatis* und *Neisseria gonorrhoeae* angegeben [Chernesky & Jang, 2006]. Diese Methode ist in der Lage signifikant mehr Chlamydien wie andere Verfahren zu detektieren [Chernesky *et al.*, 2005]. Durch die Vollautomatisierung des Systems lässt sich diese Art der Analyse sehr gut in Routinelabore eingliedern [Chernesky & Jang, 2006].

6.4 Auswertung der Resistenzstatistik

Die Antibiotikaempfindlichkeitstestung ist eine tägliche Aufgabe in Fachlaboren, um mögliche Resistenzen von pathogenen Erregern gegenüber Antibiotika festzustellen. Die Auswertung wird in einem Antibiogramm dargestellt und an den behandelnden Facharzt übermittelt. Anhand der Dokumentation auftretender Resistenzen ist abzusehen, dass die pathogenen Keime immer mehr Resistenzen ausbilden und der behandelnde Facharzt gegebenenfalls auf andere Medikamente zur Behandlung zurückgreifen muss. Für die Auswertung der Antibiogramme werden anhand der klinischen Breakpoints vorgenommen und aktualisiert [Leclercq *et al.*, 2011]. Der

Stichprobenumfang der getesteten Erreger sollte deutlich erhöht werden, um genauere Aussagen über mögliche Resistenzen treffen zu können.

Eine *Streptococcus pyogenes* Infektion wird häufig mit Penicillin G oder Amoxicillin behandelt [Stille *et al.*, 2013]. Trotz Änderungen der Virulenz sind A-Streptokokken immer noch besonders anfällig auf Penicillin [URL-18]. Die Ausbildung von Resistenzen gegenüber Levofloxacin bei *Streptococcus pyogenes* lässt sich auf die Entwicklung von Resistenzmechanismen und klonaler Beziehungen zurückführen [Alonso *et al.*, 2007]. Allerdings werden die Flurorchinolone nicht für die Therapie gegen *Streptococcus pyogenes* Infektionen verwendet.

Für die Behandlung einer *Escherichia coli* Infektion, während der Schwangerschaft oder bei relevanter hoher Keimzahl, werden Antibiotika aus der Gruppe der Carbapeneme und Cephalosporine empfohlen [Stille *et al.*, 2013]. Wobei die Carbapeneme nur während einer stationären Behandlung Anwendung finden. Die Carbapeneme, Meropenem und Imipenem, lieferten eine 100 %ige Wirksamkeit gegenüber dem Erreger *Escherichia coli*. Die getesteten Cephalosporine (Ceftibuten und Cefotaxim) waren nur zu einem geringen Teil (12,5 %) unwirksam gegenüber dem Erreger. Bei der Feststellung einer solchen Resistenz muss auf ein anderes Antibiotikum zurück gegriffen werden. *Escherichia coli* Stämme bilden immer häufiger β -Lactamasen aus und sind somit resistent gegenüber Antibiotika wie Amoxicillin und Ampicillin [Magiorakos *et al.*, 2011]. Die ausgebildeten β -Lactamasen lassen sich mit β -Lactamase-Inhibitoren blockieren, wobei die Wirksamkeit der Penicilline nicht beeinträchtigt wird [Paetzel *et al.*, 1998]. Zu den β -Lactamase-Inhibitoren gehören Clavulansäure und Sulbactam. Allerdings haben die β -Lactamase-Inhibitoren einige Nachteile. So erfolgt die Inhibierung nur bei einem Teil der β -Lactamasen. Die β -Lactamase-Inhibitoren sind zum anderen meist nur in geringen Dosen verträglich (Clavulansäure) oder nur schwach wirksam (Sulbactam) [Stille *et al.*, 2013]. Bei gewissen Mikroorganismen können die β -Lactamase-Inhibitoren sogar selbst β -Lactamasen induzieren und demzufolge die Aktivität der Penicilline verschlechtern. Als Beispiel hierfür, können *Enterobacter spp.* genannt werden.

Als Problem für die Resistenztestung von Mykoplasmen und Ureaplasmen zeigt die Abbildung 23. Eine massenhafte Kolonisation mit Hefen (zum Beispiel *Candida albicans*) macht die Auswertung des Antibiotogramms unmöglich. In diesem Fall kommt es bei jedem Antibiotikum zu einem Farbumschlag, was eine falsch positive Resistenz für Mykoplasmen und Ureaplasmen suggerieren kann. Hinzu kommt, dass auch ein Farbumschlag bei dem MYCOPLASMA DUO Kit zu einem falsch positiven Ergebnis führen kann. Es wurde beobachtet, dass dieses Problem auch auftritt, wenn sich massenhaft gramnegative Stäbchen (wie zum Beispiel *Escherichia coli*) in der Patientenprobe befinden. Sollte dies während der Diagnostik auftreten, kann keine Aussage über diese Erreger getroffen werden, weder über ihre An- bzw. Abwesenheit noch über ihre möglichen Resistenzen.



Abbildung 23: Resistenztestung mittels S.I.R. Mycoplasma und Identifizierung durch MYCOPLASMA DUO Kit

Beide Mikrotiterplatten stellen eine Patientenprobe dar. Die rechte Mikrotiterplatte suggeriert anhand des Farbumschlages von gelb nach rot einen positiven Erregernachweis für *Mycoplasma hominis* und *Ureaplasma urealyticum*. Aufgrund dieser Annahme wurde eine Resistenztestung durchgeführt. Die linke Mikrotiterplatte stellt das Ergebnis für die Resistenztestung von *Ureaplasma urealyticum* dar. Dies veranschaulicht ein falsch positives Ergebnis, da es zu einem Farbumschlag in fast allen Medikamenten gekommen ist. Deshalb lässt sich keine Aussage über das Vorhandensein und die Resistenz von Mykoplasmen und Ureaplasmen für diese Probe treffen.

Da Mykoplasmen und Ureaplasmen keine Zellwand besitzen, wirken Antibiotika zur Hemmung der Zellwandsynthese (zum Beispiel β -Lactam-Antibiotika) nicht. Clindamycin ist unwirksam bei einer *Ureaplasma urealyticum* Infektion [Stille *et al.*, 2013]. Doxycyclin weist eine Wirksamkeit von 100 % auf. Da dieses Medikament auch das Mittel der Wahl für eine Behandlung darstellt, gibt es bei der Verwendung keine

Probleme. Makrolide sind unwirksam bei *Mycoplasma hominis* Infektionen [Pereyre *et al.*, 2002]. Diese Resistenz konnte auch bei den ermittelten Resistenztestungen festgestellt werden.

Die Tabelle 33 zeigt ein Vergleich zwischen den auftretenden und den in dieser Arbeit ermittelten Resistenzen von *Staphylococcus aureus*. Die ermittelten Resistenzen liegen innerhalb der angegebenen vorkommenden Resistenz-Häufigkeiten. Außer bei Penicillinase-festen Penicillinen. Amoxicillin liegt über dem angegebenen Wert und Oxacillin unterhalb. Allerdings stellen die Werte ein Mittelmaß für die gesamte Gruppe, Penicillinase-feste Penicilline, dar und der Stichprobenumfang der Proben ist nicht groß genug. Die auftretende Häufigkeit von Penicillin G resistenten Staphylokokken unterscheidet sich zwischen Krankenhaus und den „Praxis-Staphylokokken“ [Stille *et al.*, 2013]. Die Resistenzhäufigkeit bei den im Krankenhaus kultivierten Staphylokokken liegt bei 70 - 80 % und somit um einiges höher wie die Resistenzhäufigkeit (Tabelle 33) der aus ambulanten Proben isolierten „Praxis-Staphylokokken“ [Stille *et al.*, 2013].

Für einen besseren Vergleich der Resistenzhäufigkeiten muss der Stichprobenumfang erhöht werden. Da die Tabelle 33 anhand des geringen Stichprobenumfanges nicht repräsentativ genug ist.

Tabelle 33: Gegenüberstellung der ermittelten Resistenzen und der Häufigkeit [Stille *et al.*, 2013] von *Staphylococcus aureus*

Diese Tabelle zeigt eine Gegenüberstellung der Häufigkeit [Stille *et al.*, 2013] der Resistenz von *Staphylococcus aureus* mit der in der Arbeit ermittelten Resistenz.

	Häufigkeit der Resistenz (in %)	Ermittelte Resistenz (in %)
Penicillin G	30 - 50	42,86
Amoxicillin (Penicillinase-feste Penicilline)	2 - 15	42,86
Oxacillin (Penicillinase-feste Penicilline)	2 - 15	0
Erythromycin	5 - 30	28,57
Clindamycin	5 - 15	14,29
Ciprofloxacin	10 - 15	14,29

Gegenüber Penicillin G/V bildete *Streptococcus agalactiae* keine Resistenzen aus. Diese hohe Sensibilität wird von dem Mittel der Wahl, welches zur Behandlung einer B-Streptokokken Infektion eingesetzt wird, erwartet [Andrews *et al.*, 2000]. Gleiche Resistenzen lieferten die beiden Makrolide, Erythromycin und Clarithromycin. Da beide Antibiotika eine ähnliche Struktur und die gleiche Wirkungsweise ausweisen, sind Erythromycin-resistente Streptokokken auch gegen Clarithromycin resistent [Stille *et al.*, 2013]. Bei einer Penicillin-Allergie der Patientin kommen z. B. Cefazolin oder Clindamycin zum Einsatz [Leitlinie S2k + IDA AWMF, 2012]. Die mögliche Kreuzresistenz zwischen Clindamycin und Erythromycin (induzierte Clindamycin Resistenz) kann unter Umständen auftreten. Clindamycin ist in der Lage die bakterielle Proteinbiosynthese im Peptidyl-Transferase-Zentrum der 50S-Untereinheit des Ribosoms zu hemmen [Geiss *et al.*, 2003]. Dadurch wird die Translation der mRNA verhindert. Der makrozyklische Lacton-Ring von Erythromycin ist in der Lage an der 23S-rRNA an den Nukleotiden A2058 und A2059 zu binden, um den Peptid-Exit-Channels der ribosomalen 50S-Untereinheit der Bakterien zu blockieren und einen Aufbau der 50S-Untereinheit zu inhibieren [Stille *et al.*, 2013]. Kommt es zu einem Antagonismus beider Antibiotika, erfolgt eine Methylierung an dem A2058 Nukleotid [Geiss *et al.*, 2003]. Dies führt zu einer Konformationsänderung der 23S-rRNA.

Aufgrund der überlappenden Bindestellen von Erythromycin und Clindamycin und der strukturellen Änderung der 23S-rRNA wird die Wirkung der Antibiotika inhibiert. Die induzierte Clindamycin-Resistenz führt zur Bildung einer inaktiven mRNA, welche erst wieder durch einen Induktor aktiv werden kann, um eine Methylase zu produzieren [Geiss *et al.*, 2003].

Für die Behandlung von Gonorrhö erfolgt in unkomplizierten Fällen eine einzige Antibiotikum Therapie. Da der Erreger *Neisseria gonorrhoeae* in der Lage ist schnell Resistenzen gegenüber Antibiotika auszubilden, gestaltet sich die Behandlung von Fall zu Fall sehr unterschiedlich [URL-19]. Deshalb ist eine Resistenztestung bei diesem Erreger zwingend erforderlich. Zum Beispiel ist der Gonokokken-Stamm H041 ein hoch resistenter Stamm, welcher sich nicht mehr mit Cephalosporinen behandelbar ist und eine Kombination verschiedenster Medikamente fordert [Ohnishi *et al.*, 2011].

Beide verwendeten Resistenzsysteme eignen sich für Routine Laboratorien. In Bezug auf die Gruppe der *Enterobacteriaceae* liefert das Phönix-System bessere Ergebnisse [Woodford *et al.*, 2010]. Das VITEK2-System bietet komplexere Interpretationen, wohingegen das Phönix-System jedoch frühzeitig Warnungen über mögliche Carbapenemasen Bildung von *Enterobacteriaceae* ausgibt [Woodford *et al.*, 2010]. Das Phönix-System eignet sich besonders für die Identifizierung und Resistenztestung gramnegativer und grampositiver Erreger [Noel & Iwen, 2005; White *et al.*, 2001]. Die besten Voraussetzungen für die Identifizierung von Mikroorganismen besitzt allerdings der MALDI Biotyper (Brucker) [Saffert *et al.*, 2011].

7 Ausblick

Die in dieser Arbeit verwendeten Abstriche mit festem Transportmedium, eignen sich besonders zur bakteriologischen Untersuchung. Für die PCR Analyse eignet sich ein flüssiges Transportmedium, wie zum Beispiel der eSwab, mehr. Die gallertigen Bestandteile des festen Transportmediums (Agar) könnten, die bei der DNA-Aufreinigung verwendeten Säulen, verstopfen und so zu einem falschen Ergebnis führen. Um dies zu verhindern kann der eSwab als Abstrich- und Transportsystem genutzt werden. Der eSwab besteht aus einem flüssigen Nährmedium, zur Kultivierung anspruchsvoller Mikroorganismen, mit einem Nylon-Flockfaser-Abstrichtupfer [Silbert *et al.*, 2014]. Aus der Flüssigkeit einer Probe können mehrere Untersuchungen (Antigen-Nachweis, kulturelle und PCR-basierte Methoden) erfolgen. Der Abstrichtupfer ist, aufgrund der Verwendung von Nylon-Fasern, in der Lage die Ausbeute der Probe deutlich zu steigern [Nys *et al.*, 2009].

Das BD MAX™ System von Becton Dickinson GmbH ist eine vollautomatische molekularbiologische Plattform und kombiniert die Extraktion mit dem Thermocycler [URL-20]. Zur Verfügung stehen schon verschiedene Assays und weitere werden bald auf dem Markt erscheinen. So können gegenwärtig schon Proben auf B-Streptokokken oder Staphylokokken getestet werden. Derzeit wird ein „Vaginitis Panel“ entwickelt, welches zur Analyse der bakteriellen Vaginose, Candida- und Trichomonaden-Vaginitis verwendet werden kann [URL-20]. Dieses Verfahren könnte die Diagnostik bei einfachem Handling die Labor Routine verbessern.

Sexuell übertragbare Krankheiten sind ein weltweites Problem und beeinflussen sich in Bezug auf ihre Übertragung positiv. Deshalb könnten zukünftige Arbeiten auch andere Abstriche verwenden und diese auf sexuell übertragbare Krankheiten hin untersuchen. Diese Abstriche sollten sowohl von weiblichen als auch männlichen Patienten sein. Als mögliche Abnahmeteile dieser Abstriche eignen sich genitale, anale, perianale und orale Regionen [Wagenlehner *et al.*, 2016]. Als Nachweismethoden werden Nukleinsäure-Amplifikationsverfahren bevorzugt, da diese Sensitivitäten und Spezifitäten von über 90 % aufweisen und dadurch anderen Nachweismethoden überlegen sind [Wagenlehner *et al.*, 2016].

Literaturverzeichnis

Alonso R.; Mateo E.; Ezpeleta G. & Cisterna R. (2007): Characterisation of levofloxacin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* in Bilbao, Spain. International Journal of Antimicrobial Agents. Volume 30, Issue 2, Pages 183–185

Andrews J. I.; Diekema D. J.; Hunter S. K.; Rhomberg P. R.; Pfaller M. A.; Jones R. N. & Doern G. V. (2000): Group B streptococci causing neonatal bloodstream infection: Antimicrobial susceptibility and serotyping results from SENTRY centers in the Western Hemisphere; American Journal of Obstetrics & Gynecology; Volume 183; Ausgabe 4; Seiten 859–862

Cartwright C. P.; Lembke B. D.; Ramachandran K.; Body B. A.; Nye M.B.; Rivers C. A. & Schwebke J. R. (2013): Comparison of Nucleic Acid Amplification Assays with BD Affirm VPIII for Diagnosis of Vaginitis in Symptomatic Women; Journal of Clinical Microbiology; Volume 51; Number 11; p. 3694–3699

Cauci S.; Driussi S.; Monte R.; Lanzafame P.; Pitzus E. & Quadrifoglio F. (1998): Immunoglobulin A response against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and sialidase activity in bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 1998; 178: 511–5

Chernesky M. A. & Jang D. E. (2006): APTIMA transcription-mediated amplification assays for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*; Expert Review of Molecular Diagnostics; Volume 6; Ausgabe 4; Seiten 519-525

Chernesky M. A.; Jang D. E.; Luinstra K.; Chong S.; Smieja M.; Cai W.; Hayhoe B.; Portillo E.; MacRitchie C.; Main C. & Ewert R. (2005): High Analytical Sensitivity and Low Rates of Inhibition May Contribute to Detection of *Chlamydia trachomatis* in Significantly More Women by the APTIMA Combo 2 Assay; Journal of Clinical Microbiology Volume 44, Ausgabe 2 Seiten 400–405

- Cunningham S. A., Mandrekar J. N., Rosenblatt J. E. & Patel R. (2013): Rapid PCR Detection of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Ureaplasma parvum*. Hindawi Publishing Corporation. International Journal of Bacteriology. Volume 2013, Article ID 168742, Seiten 1-7
- Darai G., Handermann M., Sonntag H.-G. & Zöller L. (2012): Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe4., vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage. ISBN 978-3-642-17157-4. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York
- Donders G (2004): Das Mikroskop in der gynäkologischen Praxis: Obsolet oder unzureichend genützt? Speculum - Zeitschrift für Gynäkologie und Geburtshilfe 2004; 22 (1) (Ausgabe für Schweiz), 14 - 23
- Donders G.; De Wet H.G.; Hooft P. & Desmyter J. (1993): Lactobacilli in Papanicolaou smears, genital infections, and pregnancy. Am J Perinatol; 10(5):358-61.
- Döderlein A. S. G. (1892): Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. Verlag von Eduard Besold. Leipzig
- EUCAST (02.05.2016): European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0 vom 01.01.2014 URL: <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf>
- Eun H. S.; Lee S. M.; Park M. S.; Park K. I.; Namgung R. & Lee C. (2013): Serological investigation of *Ureaplasma urealyticum* in Korean preterm infants; Korean J Pediatr 2013;56(11):477-481
- Fuchs B. (2012) Analysis of phospholipids and glycolipids by thin-layer chromatography-matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A., 1259: 62 - 73

Geiss H.; Mack D. & Seifert H. (2003): Konsensuspapier zur Identifizierung von speziellen Resistenzmechanismen und zur Interpretation von Ergebnissen der Antibiotikaempfindlichkeitstestung bei grampositiven und gramnegativen Erregern; URL: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Erreger_ausgewaehlt/ESBL/ESBL_LIT_02.pdf?__blob=publicationFile

Harmanli O. H., Cheng G. Y., Nyirjesy P., Chatwani A. & Gaughan J.P. (2000): Urinary tract infections in women with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 710-2

Kim s., Ruparel H. D., Gilliam T. C. & Ju j. (2003): Digital genotyping using molecular affinity and mass spectrometry. *Nature Reviews Genetics* 4, 1001-1008

Leclercq R.; Canto R.; Brown D. F. J.; Giske C. G.; Heisig P.; MacGowan A. P.; Mouton J. W.; Nordmann P.; Rodloff A. C.; Rossolini G. M.; Soussy C.-J.; Steinbakk M.; Winstanley T. G. & Kahlmeter G. (2011): EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing; *Clinical Microbiology and Infection*; 19 : 141–160

Leitfaden STI-Therapie DSTIG (2014): Hinweise zur Therapie ausgewählter sexuell übertragbarer Infektionen (STI) der Deutschen STI-Gesellschaft zur Förderung der sexuellen Gesundheit; 2. Auflage Version 2.1 2014/2015

Leitlinie S1 AWMF (2013): Bakterielle Vaginose (BV) in Gynäkologie und Geburtshilfe; AWMF-Register Nr. 015/028 Klasse: S1

Leitlinie S2k AWMF (2013): Gonorrhoe bei Erwachsenen und Adoleszenten; AWMF-Register Nr. 059/004 Klasse: S2k

Leitlinie S2k + IDA AWMF (2012): Prophylaxe der Neugeborenssepsis - frühe Form - durch Streptokokken der Gruppe B; AWMF-Register Nr. 024/020; Entwicklungsstufe: 2k + IDA

Magiorakos A.-P.; Srinivasan A.; Carey R. B.; Carmeli Y.; Falagas M. E.; Giske C. G.; Harbarth S.; Hindler J. F.; Kahlmeter G.; Olsson-Liljequist B.; Paterson D. L.; Rice L. B.; Stelling J.; Struelens M. J.; Vatopoulos A.; Weber J. T. & Monnet D. L. (2011): Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance; *Clinical Microbiology and Infection*; Volume 18, Ausgabe 3, Seiten 268–281

Mendling W.; Swidsinski A. & Swidsinski S. (2006): Adhärenter Biofilm bei bakterieller Vaginose: Hatte Gardner doch Recht?; *Diagnostik + Therapie Frauenarzt*; 47, Nr. 4

MiQ 10, 11a, 11b 2011 (Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards); Podbielski A.; Herrmann M.; Kniehl E.; Mauch H.; Rüssmann H.; 2. Auflage; ISBN: 978-3-437-41593-7

Morada M.; Manzur M.; Lam B.; Tan C.; Tachezy J.; Rappelli P.; Dessì D.; Fiori p. L. & Yarlett N. (2010): Arginine metabolism in *Trichomonas vaginalis* infected with *Mycoplasma hominis*. *Microbiology*. 2010 Dec; 156(Pt 12): 3734–3743.

Neumeister B.; Geiss H. K.; Braun R. W. & Kimmig P. (2009): Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie. - 2. vollständig überarbeitete Auflage; ISBN: 978-3-13-743602-7; Stuttgart: Thieme

Noel R. K. & Iwen P. C. (2005): Clinical Evaluation Comparing the BD Phoenix TM Automated Microbiology System with the MicroScan [®] WalkAway for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species; 105th General Meeting of the American Society for Microbiology

Nugent R.P.; Krohn M.A. & Hillier S.L. (1991): Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *Journal of Clinical Microbiology*; Volume 29; Seiten 297-301

Nys S.; Vijgen S.; Magerman K. & Cartuyvels R. (2009): Comparison of Copan eSwab with the Copan Venturi Transystem for the quantitative survival of *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* and *Candida albicans*; Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; Volume 29; Ausgabe 4; Seiten 453–456

Ohnishi M.; Golparian D.; Shimuta K.; Saika T.; Hoshina S.; Iwasaku K.; Nakayama S.; Kitawaki J. & Unemo M. (2011): Is *Neisseria gonorrhoeae* Initiating a Future Era of Untreatable Gonorrhea?: Detailed Characterization of the First Strain with High-Level Resistance to Ceftriaxone; Antimicrobial Agents and Chemotherapy; Volume 55; Ausgabe 7; Seiten 3538–3545

Paetzel M.; Dalbey R. E. & Strynadka N. C. J. (1998): Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a bold beta-lactam inhibitor; Nature 396, 186-190

Pereyre S.; Gonzalez P.; De Barbeyrac B.; Darnige A.; Renaudin H.; Charron A.; Raheison S.; Bébéar C. & Bébéar C. M. (2002): Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*; Antimicrob Agents Chemother; 46(10):3142-50

Saffert R. T.; Cunningham S. A.; Ihde S. M.; Jobe K. E. M.; Mandrekar J. & Patel R. (2011): Comparison of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometer to BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification of Gram-Negative Bacilli; Journal of Clinical Microbiology; Volume 49; Ausgabe 3; Seiten 887–892

Sha B. E.; Chen H. Y.; Wang Q. J.; Zariffard M. R.; Cohen M. H. & Spear G. T. (2005): Utility of Amsel Criteria, Nugent Score, and Quantitative PCR for *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Lactobacillus* spp. for Diagnosis of Bacterial Vaginosis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women; Journal of Clinical Microbiology; Volume 43; Ausgabe 9; Seiten 4607–4612

Silbert S.; Kubasek C.; Uy D. & Widen R. (2014): Comparison of ESwab with Traditional Swabs for Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Using Two Different Walk-Away Commercial Real-Time PCR Methods; Journal of Clinical Microbiology; Volume 52; Ausgabe 7; Seiten 2641–2643

Sung T.-J. (2013): *Ureaplasma urealyticum* or *Ureaplasma parvum*: what's the difference? Korean J Pediatr 2013; 56(11):474-476

Stille W.; Brodt, H.-R.; Groll A. H. & Just-Nübling G. (2013): Antibiotika-Therapie: Klinik und Praxis der antifektiösen Behandlung; 11. Auflage; ISBN: 3-7945-2160-9; Stuttgart: Schattauer

Thomas L. (2005): Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik; 6. Auflage; ISBN: 3-9805215-5-9; TH-Books-Verlags-Gesellschaft

Ugwumadu A.; Manyonda I.; Reid F & Hay P. (2003): Effect of early oral clindamycin on late miscarriage and preterm delivery in asymptomatic women with abnormal vaginal flora and bacterial vaginosis: a randomised controlled trial; The Lancet; Volume 361, No. 9362, p983–988

URL-1 (03.04.2016): Nugent-Score zur Diagnose der bakteriellen Vaginose; URL: <http://www.ladr.de/sites/all/themes/cont/files/_02_pdfs/01_medizin/03_information/ladr-informiert/info221a.pdf>

URL-2 (15.04.2016): Infektionsschutzgesetz - IfSG; URL: <http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/IfSG/ifsg_node.html>

URL-3 (04.05.2016): Verordnung des Sächsischen Staatsministeriums für Soziales und Verbraucherschutz über die Erweiterung der Meldepflicht für übertragbare Krankheiten und Krankheitserreger nach dem Infektionsschutzgesetz; URL: <<http://revosax.sachsen.de/vorschrift/1307-IfSGMeldeVO#p2>>

URL-4 (10.05.2106): Störung des Scheidenmilieus (der Scheidenflora) URL: <<http://www.apotheken.de/aktuell/sondertext/thema/stoerung-des-scheidenmilieus/>>

URL-5 (10.05.2016): Wolf E.; Vaginalflora in Aufruhr; URL: <<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=30817>>

URL-6 (10.05.2016): Hybridisierungstechniken; URL: <<http://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/hybridisierungstechniken/5727>>

URL-7 (11.05.2016): Aptima Combo 2 for CT/NG assay; URL: <<http://www.hologic.com/products/clinical-diagnostics-blood-screening/assays-and-tests/aptima-combo-2-ctng-assay>>

URL-8 (12.05.2016): Informationen zu Medikamenten Metronidazol; URL: <<https://www.embryotox.de/metronidazol.html>>

URL-9 (12.05.2016): Informationen zu Medikamenten Amoxicillin; URL: <<https://www.embryotox.de/amoxicillin.html>>

URL-10 (13.05.2016): Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Mikrobouillondilution; URL: <<http://www.uniklinik-ulm.de/struktur/institute/medizinische-mikrobiologie-und-hygiene/home/diagnostik/leistungen/empfindlichkeitspruefung/verfahren.html#c9455>>

URL-11 (13.05.2016): Schwarz S., Böttner A., Kehrenberg C., Kietzmann M., Klarmann D., Klein G., Krabisch P., Kühn T., Luhofer G., Richter A., Sigge C., Träger W., Waldmann K.-H., Wallmann J., Werckenthin C.; Ergebnisse der Arbeitsgruppe "Antibiotikaresistenz" der DVG zur Standardisierung der Resistenzprüfung und zur Festlegung veterinärspezifischer Grenzwerte; URL: <<http://www.dvg.net/avid/22tag/31-Schwarz.pdf>>

URL-12 (25.05.2016): MALDI Biotyper CA System; URL: <https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/MALDI-biotyper-CA-Brochure_08-2014_ebook.pdf>

URL-13 (17.05.2016): Informationen zu Medikamenten Ceftriaxon; URL: <<https://www.embryotox.de/ceftriaxon.html>>

URL-14 (17.05.2016): Informationen zu Medikamenten Doxycyclin; URL: <<https://www.embryotox.de/doxycyclin.html>>

URL-15 (17.05.2016): FERTILITÄTSDIAGNOSTIK; URL: <<http://www.medical-labor.ch/index.php/kinderlosigkeit.html>>

URL-16 (17.05.2016): Ureaplasma urealyticum; URL: <<http://www.geschlechtskrankheiten.de/ureaplasma-urealyticum/#therapie-einer-ureaplasma-urealyticum-infektion>>

URL-17 (06.06.2016): Panther system; URL: <<http://www.hologic.com/products/clinical-diagnostics-and-blood-screening/instrument-systems/panther-system>>

URL-18 (15.06.2016): Stevens D. L.; *Streptococcus pyogenes* (Group A β -hemolytic Streptococcus); URL: <<http://www.antimicrobe.org/b239.asp>>

URL-19 (28.06.2016): Gonorrhoe / Tripper; URL: <<http://www.dstig.de/was-sind-stdsti/gonorrhoe.html>>

URL-20 (04.07.2016): BD MAXTM System; URL: <<http://moleculardiagnosics.bd.com/product/max/>>

Van Dyck E.; Ieven M.; Pattyn S.; Van Damme L. & Laga M. (2001): Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae by Enzyme Immunoassay, Culture, and Three Nucleic Acid Amplification Tests; Journal of Clinical Microbiology; Volume 39; Ausgabe 5; Seiten 1751-1756

Wagenlehner F. M. E.; Brockmeyer N. H.; Discher T.; Friese K. & Wichelhaus T. A. (2016): The presentation, diagnosis and treatment of sexually transmitted infections; Deutsches Ärzteblatt; Volume 113, Seiten 11-22

Waites K. B; Katz B. & Schelonka R. L. (2005): Mycoplasmas and Ureaplasmas as Neonatal Pathogens; Clinical Microbiology Reviews; Volume 18; Ausgabe 4; Seiten 757–789

Wenderlein J. M. (2015): Endokrinologie. Urogenitales Menopause-Syndrom mehr beachten; Geburtshilfe Frauenheilkunde (Georg Thieme Verlag KG Stuttgart); 75(5): 424-427

White V.; Fischbein K.; Dunk T.; Williams W.; Reuben J. & Salomon J. (2001): Identification Accuracy of Gram-Negative Bacilli in the BD Phoenix TM Automated Microbiology System; 101st General Meeting of the American Society for Microbiology, Poster C-339

Willoughby J. J.; Russell W. C.; Thirkell D. & Burdon M. G. (1991): Isolation and Detection of Urease Genes in *Ureaplasma urealyticum*. Infection and Immunity, Vol. 59, No. 7, p. 2463-2469

Woodford N.; Eastaway A. T.; Ford M.; Leanord A.; Keane C.; Quayle R. M.; Steer J. A.; Zhang J. & Livermore D. M. (2010): Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan Automated Systems for Detection and Inference of Mechanisms Responsible for Carbapenem Resistance in *Enterobacteriaceae*; Journal of Clinical Microbiology; Volume 48; Ausgabe 8; Seiten 2999–3002

Anhang**Tabelle 34: Resistenztestung von *Streptococcus pyogenes* (n = 5)****Diese Tabelle zeigt die Auswertung der Resistenztestungen von *Streptococcus pyogenes* (n = 5).**

	Sensibel	Intermediär	Resistent
Cotrimoxazol	5 (100 %)		
Linezolid	5 (100 %)		
Doxycyclin	5 (100 %)		
Levofloxacin	3 (60 %)		2 (40 %)
Moxifloxacin	3 (60 %)		2 (40 %)
Clindamycin	5 (100 %)		
Vancomycin	5 (100 %)		
Erythromycin	5 (100 %)		
Clarithromycin	5 (100 %)		
Meropenem	5 (100 %)		
Imipenem	5 (100 %)		
Ceftibuten	5 (100 %)		
Cefotaxim	5 (100 %)		
Cefpodoxim-Proxetil	5 (100 %)		
Amoxicillin/Clavulansre.	5 (100 %)		
Ampicillin/Sulbactam	5 (100 %)		
Cefuroxim-Axetil	5 (100 %)		
Piperacillin	5 (100 %)		
Amoxicillin	5 (100 %)		
Ampicillin	5 (100 %)		
Penicillin G/V	5 (100 %)		

Tabelle 35: Resistenztestung von *Escherichia coli* (n = 8)**Diese Tabelle zeigt die Auswertung der Resistenztestungen von *Escherichia coli*. Von insgesamt 13 nachgewiesenen Erregern wurde nur in 8 Fällen ein Antibiogramm erstellt.**

	Sensibel	Intermediär	Resistent
Levofloxacin	7 (87,5 %)		1 (12,5 %)
Cotrimoxazol	8 (100 %)		
Ciprofloxacin	7 (87,5 %)		1 (12,5 %)
Gentamicin	8 (100 %)		
Meropenem	8 (100 %)		
Imipenem	8 (100 %)		
Cefixim	7 (87,5 %)		1 (12,5 %)
Ceftibuten	7 (87,5 %)		1 (12,5 %)
Cefpodoxim-Proxetil	7 (87,5 %)		1 (12,5 %)

Ceftazidim	7 (87,5 %)	1 (12,5 %)	
Cefuroxim-Axetil	7 (87,5 %)		1 (12,5 %)
Cefotaxim	7 (87,5 %)		1 (12,5 %)
Piperacillin	5 (62,5 %)		3 (37,5 %)
Amoxicillin/Clavulansre.	5 (62,5 %)		3 (37,5 %)
Ampicillin/Sulbactam	5 (62,5 %)		3 (37,5 %)
Amoxicillin	4 (50 %)		4 (50 %)
Ampicillin	4 (50 %)		4 (50 %)

Tabelle 36: Resistenztestung von *Ureaplasma urealyticum* (n = 43)

Diese Tabelle zeigt die Auswertung der Resistenztestungen von *Ureaplasma urealyticum*. Von insgesamt 60 nachgewiesenen Erregern wurde nur in 43 Fällen ein Antibiotogramm erstellt.

	Sensibel	Intermediär	Resistent
Ofloxacin	35 (81,4 %)	8 (18,6 %)	
Doxycyclin	43 (100 %)		
Tetracyclin	42 (97,67 %)	1 (2,33 %)	
Clindamycin			43 (100 %)
Azithromycin	43 (100 %)		
Erythromycin	32 (74,42 %)	11 (25,58 %)	

Tabelle 37: Resistenztestung von *Mycoplasma hominis* (n = 5)

Diese Tabelle zeigt die Auswertung der Resistenztestungen von *Mycoplasma hominis*. Von insgesamt 8 nachgewiesenen Erregern wurde nur in 5 Fällen ein Antibiotogramm erstellt.

	Sensibel	Intermediär	Resistent
Ofloxacin	5 (100 %)		
Doxycyclin	5 (100 %)		
Tetracyclin	5 (100 %)		
Clindamycin	5 (100 %)		
Azithromycin			5 (100 %)
Erythromycin		1 (20 %)	4 (80 %)

Tabelle 38: Resistenztestung von *Staphylococcus aureus* (n = 7)

Diese Tabelle zeigt die Auswertung der Resistenztestungen von *Staphylococcus aureus* (n = 7).

	Sensibel	Intermediär	Resistent
Fusidinsäure	7 (100 %)		
Cotrimoxazol	7 (100 %)		
Moxifloxacin	6 (85,71 %)		1 (14,29 %)
Ciprofloxacin	6 (85,71 %)		1 (14,29 %)

Tetracyclin	7 (100 %)		
Linezolid	7 (100 %)		
Teicoplanin	7 (100 %)		
Vancomycin	7 (100 %)		
Clindamycin	6 (85,71 %)		1 (14,29 %)
Erythromycin	5 (71,43 %)		2 (28,57 %)
Gentamicin	7 (100 %)		
Cefixim	3 (42,86 %)		4 (57,14 %)
Cefpodoxim-Proxetil	7 (100 %)		
Cefadroxil	7 (100 %)		
Cefaclor	7 (100 %)		
Cefalexin	7 (100 %)		
Amoxicillin/Clavulansre.	7 (100 %)		
Ampicillin/Sulbactam	7 (100 %)		
Amoxicillin	4 (57,14 %)		3 (42,86 %)
Oxacillin	7 (100 %)		
Penicillin G/V	4 (57,14 %)		3 (42,86 %)

Tabelle 39: Resistenztestung von *Streptococcus agalactiae* (n = 27)

Diese Tabelle zeigt die Auswertung der Resistenztestungen von *Streptococcus agalactiae*. Von insgesamt 44 nachgewiesenen Erregern wurde nur in 27 Fällen ein Antibiotogramm erstellt. In zwei Fällen konnte eine induzierte Clindamycin-Resistenz nachgewiesen werden.

	Sensibel	Intermediär	Resistent
Cotrimoxazol	27 (100 %)		
Moxifloxacin	27 (100 %)		
Levofloxacin	27 (100 %)		
Doxycyclin	5 (18,52 %)		22 (81,48 %)
Clarithromycin	18 (66,67 %)		9 (33,33 %)
Clindamycin	20 (74,07 %)		7 (25,93 %)
Vancomycin	27 (100 %)		
Linezolid	27 (100 %)		
Imipenem	27 (100 %)		
Meropenem	27 (100 %)		
Erythromycin	18 (66,67 %)		9 (33,33 %)
Ceftibuten	27 (100 %)		
Cefpodoxim-Proxetil	27 (100 %)		
Cefuroxim-Axetil	27 (100 %)		
Cefotaxim	27 (100 %)		
Piperacillin	27 (100 %)		

Amoxicillin/Clavulansre.	27 (100 %)		
Ampicillin/Sulbactam	27 (100 %)		
Amoxicillin	27 (100 %)		
Ampicillin	27 (100 %)		
Penicillin G/V	27 (100 %)		

Tabelle 40: Resistenztestung von *Neisseria gonorrhoeae* (n = 2)

Diese Tabelle zeigt die Auswertung der Resistenztestungen von *Neisseria gonorrhoeae*. Es wurden von zwei verschiedenen Patienten die Antibiogramme erstellt.

	Patient A	Patient B
Ciprofloxacin	S	R
Azithromycin	S	/
Cefpodoxim-Proxetil	S	S
Penicillin G/V	S	I
Cefotaxim	S	S

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 19.08.2016

Kristin Scharf